

Eugenia Podgórska,
Zdzisław Targoński

Katedra Technologii Przemysłu
Rolno-Spożywczego
i Przechowalnictwa
Akademia Rolnicza
Lublin

Wykorzystanie słomy pszennej i trocin drzewnych do biosyntezy celulaz przez mutanty *Trichoderma reesei*

Pośród grzybów wydzielających zewnątrzkomórkowe celulazy największym zainteresowaniem cieszy się *Trichoderma reesei* i jej mutanty. Biosynteza celulaz przez większość grzybów celololitycznych jest związana z obecnością w podłożu hodowlanym induktorów syntezy tych enzymów, do których w pierwszym rzędzie zalicza się celulozę, gdyż spełnia również rolę źródła węgla i energii. W celu obniżenia kosztów produkcji celulaz, w miejsce dotychczas stosowanych czystych substratów celulozowych, tj. *Avicel*, *Solca Floc* czy pulpy drzewnej, stosuje się ogólnie dostępne substraty lignocelulozowe (4). W zależności od rodzaju użytego substratu lignocelulozowego, sposobu jego przygotowania do biokonwersji, uzyskuje się z hodowli grzybów, filtraty o różnej aktywności celololitycznej.

Tangnu i wsp. (8) stwierdzili, że aktywności filtratów pochodzących otrzymanych z *T. reesei* (RUT-C-30) na natywnych lodygach kukurydzy wynosiły 0,28 FPU/cm³, podczas gdy po obróbce alkalicznej tych lodyg uzyskano 2,0 FPU/cm³. Wysokie aktywności celololityczne filtratów pochodzących, wynoszące 3,7 FPU/cm³ uzyskali Chahal i wsp. (4) w wyniku hodowli *T. reesei* na celulozie otrzymanej po parowoeksplozyjnym traktowaniu topoli.

Celem pracy było przebadanie wstępnie przygotowanej słomy pszennej oraz trocin brzo-
wych i sosnowych jako źródeł węgla do biosyntezy celulaz przez *T. reesei* QM 9414 i jej mutanty.

Materiały i metody

Szczepy

Szczep *Trichoderma reesei* F-522 (QM-9414) otrzymano z Czechosłowackiej Kolekcji Drobnoustrojów w Brnie. Mutanty tego szczepu otrzymano w wyniku mutacji NTG i metody selekcji opisanej przez Bujaka i wsp. (3).

Przygotowanie materiałów lignocelulozowych do biokonwersji

Słomę pszenną, trociny brzo-
we i sosnowe poddawano parowaniu w temp. 200°C w autoklawie przez 5 min dla słomy i 10 min dla trocin, jak opisał Targoński (9).

Przed obróbką surowiec rozdrabniano i przesiewano otrzymując frakcje o wielkości cząstek od 0,43 do 1,5 mm. Następnie, przemywano wodą, 1% roztworem NaOH i ponownie wodą do uzyskania pH obojętnego. Potem materiał suszono w temp. 105°C przez 24 godz.

Biosynteza celulaz

Hodowle *T. reesei* prowadzono na pożywce wg Mandels-Webera (5) stosując dodatek, otrzymanych w wyniku obróbki, materiałów lignocelulozowych w ilości 1, 2 i 3% dla słomy i 1% dla trocin. Ponadto do podłoża ze słomą dodawano celulozę MN-300 (Macherey, Nagel Co.) w stosunku 3:1. Inoculum stanowiła zawiesina grzybni przygotowana ze skosu.

Hodowle prowadzono przez 14 dób pobierając okresowo próbki.

Oznaczanie aktywności enzymatycznych

Aktywności celulolityczne oznaczano wg metody zalecanej przez IUPAC (11) z wykorzystaniem bibuly Whatman 1, a β -glukozydazę z zastosowaniem salicyny.

Wyniki

1. Wpływ zwiększonych dawek wstępnie przygotowanej słomy pszennej na biosyntezę celulaz

Wartość pH podłoża hodowli *T. reesei* ma duży wpływ na biosyntezę celulaz i β -glukozydazy dlatego oznaczono pH obok aktywności enzymatycznych we wszystkich kombinacjach hodowlanych.

W przypadku podłoża zawierającego w swoim składzie 1% słomy pH wzrosło z 5,3 do 6,3–6,6 po trzech dobach, a następnie utrzymywało się na poziomie około 6, aby w ostatnich dniach ulec obniżeniu do pH 5,1–5,3, w hodowlach mutantów M_1 i M_3 (rys. 1a).

Najwyższe aktywności uzyskano po 9 dobach hodowli dla szczepu wyjściowego i mutantu M_3 (1,1 FPU), zaś dla mutantu M_1 – 0,8 FPU i stanowiły od 92 do 60% aktywności otrzymanych w równolegle prowadzonych hodowlach ze sproszkowaną celulozą (rys. 1b). Natomiast aktywności β -glukozydazy były wyższe w hodowlach z 1% słomy pszennej od uzyskanych w hodowlach z celulożą (tab. 1).

Po 9 dobach stwierdzono maksymalne wartości β -glukozydazy (34–38 nM/cm³min), wyższe o 130% dla szczepu wyjściowego i od 40 do 80% dla mutantów od wartości uzyskanych w 8 dniu hodowli z celulożą. Jest to związane z wyższym pH podłoża hodowlanego podczas namnażania *T. reesei* na słomie, gdyż podwyższone pH sprzyja biosyntezie tego enzymu.

W hodowlach zawierających 2% słomy pszennej pH podłoża utrzymywało się prawie na jednakowym poziomie 6,1–6,8, podczas gdy w hodowlach z 3% słomy było mniej stabilne i po 8 dobach, tj. wówczas gdy stwierdzono maksymalne aktywności celulolityczne, było zdecydowanie niższe i wynosiło od 4,5 do 5,6 (tab. 1). Wprowadzenie do pożywki zwiększonej ilości słomy do 3% wpłynęło na wzrost FPU od 2 do 4 razy w porównaniu do aktywności uzyskanych w hodowlach zawierających 1% tego substratu.

Aktywności β -glukozydazy osiągnęły najwyższe wartości w hodowlach z 2% słomy i były one ok. 6–7-krotnie wyższe od analogicznych uzyskanych w podłożach z 1% słomy. Natomiast, obniżenie aktywności β -glukozydazy w hodowlach z 3% słomy było związane z obniżeniem pH podłoża hodowlanego (tab. 1).

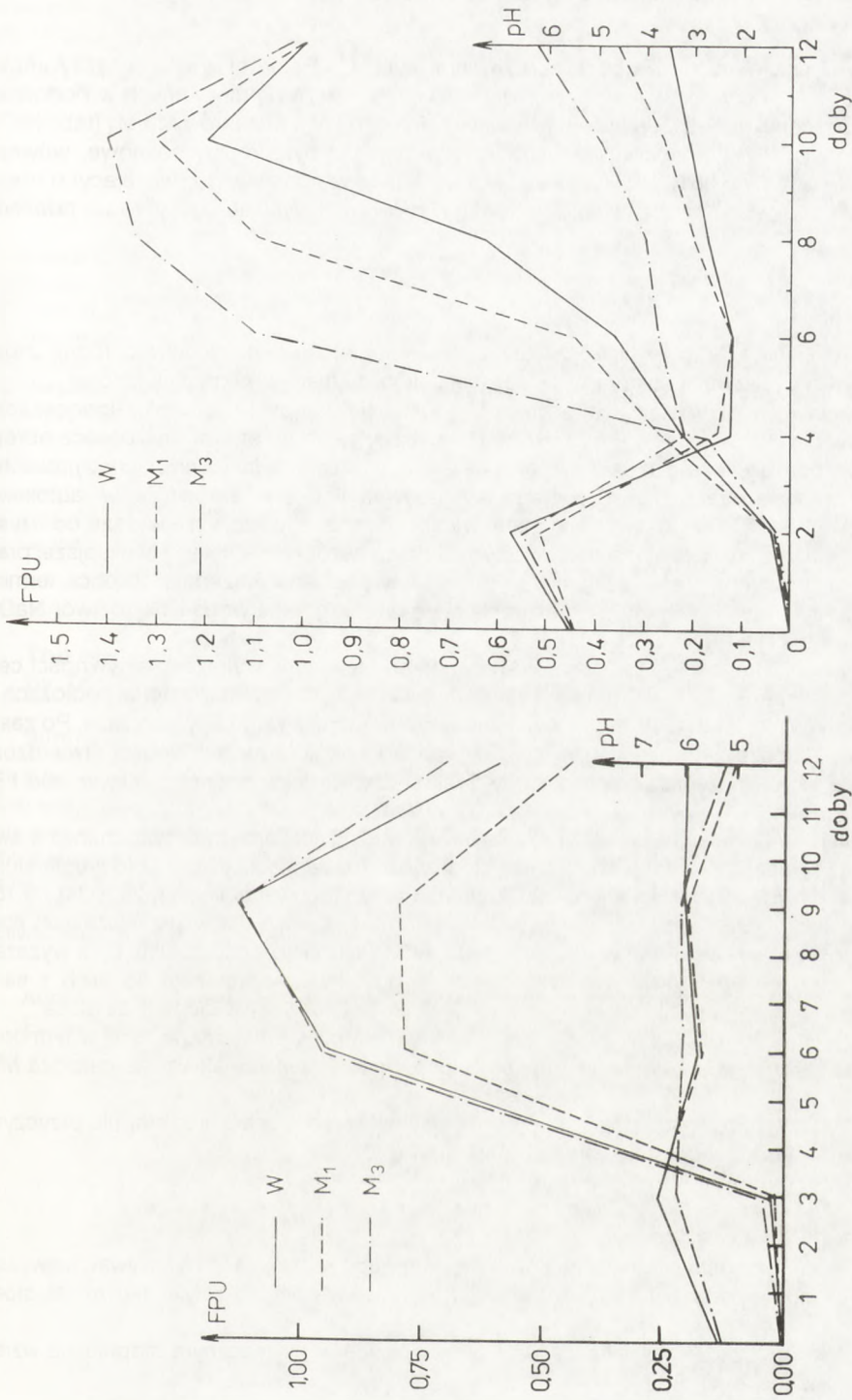
2. Wpływ dodatku czystej celulozy na biosyntezę celulaz przez *T. reesei*

Struktura celulozy, a w szczególności wysoki stopień jej krystaliczności, odpowiednia powierzchnia właściwa, zawartość innych składników mają wpływ na końcową aktywność filtratów hodowlanych badanego grzyba. Dodatek wysokokrystalicznej celulozy do substratów lignocelulozowych może przyczynić się do zwiększenia biosyntezy celulaz przez *T. reesei*. Dlatego też w następnych doświadczeniach źródłem węgla, obok wstępnie przygotowanej słomy, była celuloza dodana w stosunku 3:1. Wówczas pH podłoża osiągnęło po 9 dobach hodowli wartości od 6,2 do 6,6 (tab. 1). Aktywności celulolityczne w hodowlach zawierających 1% słomy z celulożą (3:1) nie uległy zwiększeniu w porównaniu do hodowli z 1% słomy. Wprowadzenie zaś do pożywki dwu- i trzykrotnej ilości źródła węgla spowodowało niewielki wzrost FPU od 10 do 20% w stosunku do hodowli zawierających słomę pszenną. Natomiast dodanie celulozy do podłoża ze słomą wpłynęło na zwiększenie aktywności β -glukozydazy średnio o ok. 25% (tab. 1).

Tabela 1
 Maksymalne aktywności celulolityczne w cieczach po hodowli *T. reesei* QM 9414 (W) i jej mutantów (M₁, M₃) na różnych źródłach węgla

| Źródła węgla | Stężenie w podłożu (%) | Badane szczepy | | | | | | | | |
|--------------------------------------|------------------------|----------------|----------------------------|---------------------------------------|----------------|----------------------------|---------------------------------------|----------------|----------------------------|---------------------------------------|
| | | W | | | M ₁ | | | M ₃ | | |
| | | pH | FPU $\mu\text{M/cm}^3$ min | β -gluk. $\mu\text{M/cm}^3$ min | pH | FPU $\mu\text{M/cm}^3$ min | β -gluk. $\mu\text{M/cm}^3$ min | pH | FPU $\mu\text{M/cm}^3$ min | β -gluk. $\mu\text{M/cm}^3$ min |
| sproszkowana celuloza MN-300 | 1 | 3,13 | 1,20 | 0,015 | 3,56 | 1,33 | 0,024 | 5,04 | 1,44 | 0,021 |
| słoma pszenna po wstępnej obróbce | 1 | 6,07 | 1,12 | 0,034 | 6,10 | 0,80 | 0,035 | 6,24 | 1,12 | 0,038 |
| | 2 | 6,43 | 2,52 | 0,250 | 6,13 | 2,18 | 0,240 | 6,35 | 2,60 | 0,240 |
| | 3 | 4,85 | 2,64 | 0,169 | 4,50 | 3,40 | 0,180 | 5,60 | 2,80 | 0,169 |
| słoma pszenna + celuloza (3:1) | 1 | 6,30 | 1,10 | 0,043 | 6,37 | 0,92 | 0,040 | 6,30 | 1,03 | 0,044 |
| | 2 | 6,60 | 2,72 | 0,370 | 6,50 | 2,41 | 0,290 | 6,45 | 2,41 | 0,286 |
| | 3 | 6,35 | 2,90 | 0,230 | 6,25 | 3,33 | 0,200 | 6,24 | 3,28 | 0,200 |
| trociny brzozone po wstępnej obróbce | 1 | 6,29 | 0,61 | n.o. | 4,30 | 0,50 | n.o. | 3,70 | 0,71 | n.o. |
| trociny sosnowe po wstępnej obróbce | 1 | 6,90 | 0,13 | n.o. | 6,70 | 0,16 | n.o. | 6,85 | 0,18 | n.o. |

n.o. - nie oznaczano



Rys. 1. Zmiany w aktywnościach celulolitycznych (FPU) i pH podczas hodowli *T. reesei* QM 9414 (W) oraz mutantów M₁ i M₃ wykorzystujących jako źródło węgla: a) 1% słomy pszennej, b) 1% celulozy MN-300.

3. Zastosowanie trocin brzożowych i sosnowych jako źródeł węgla w hodowlach *T. reesei*

Aktywności celulolityczne w hodowlach zawierających 1% trocin brzożowych, przygotowanych wg sposobu podanego w metodyce, były o 45 i 37% niższe od uzyskanych w hodowlach z 1% słomy pszennej po 9 dobach dla szczepu wyjściowego (W) i mutantów M₁ i M₃ (tab. 1).

Najniższe wyniki aktywności uzyskiwano, gdy w podłożu były trociny sosnowe, wówczas FPU stanowiło od 22 do 30% tej aktywności jaką wykazano w hodowlach zawierających trociny brzożowe. pH pożywki w czasie trwania hodowli grzybów było wysokie i oscylowało pomiędzy 6,7–6,9 (tab. 1).

Dyskusja

Liczne badania (1,3,7) wykazują, że grzyb *T. reesei* może wykorzystywać różne źródła węgla. Jednak najlepszymi induktorami celulaz jest celuloza i materiały lignocelulozowe.

Istotną rzeczą jest przygotowanie do mikrobiologicznej degradacji surowców lignocelulozowych tak, aby ułatwić penetrację enzymów do cząsteczek celulozy. Stosowano oprócz obróbki mechanicznej obróbkę alkaliczną słomy pszennej (1,7), promieniowanie jonizujące (2), obróbkę alkaliczną i kwaśną oraz 70% roztworem etylenodwuminy (6), parowanie w autoklawie w obecności 1% HCl i SO₂ (10) i in. Otrzymane wyniki były różne, ale zawsze wyższe od uzyskiwanych w pracach z surowcem nie poddawanym żadnym obróbkom. Dlatego w niniejszej pracy stosowano rozdrobnioną słomę pszeną czy też trociny poddane uprzednio obróbce termiczno-ciśnieniowej (200°C i 14,5 atm.), a następnie chemicznej (gorąca woda i 1% roztwór NaOH) w celu usunięcia lignin (9).

W hodowlach *T. reesei* – z tak przygotowaną słomą pszeną – wykazano aktywności celulolityczne dla szczepu wyjściowego niższe zaledwie o około 10% od aktywności w podłożach ze sproszkowaną celulozą MN-300. W hodowlach mutantów różnice w FPU były wyższe. Po zastosowaniu trocin brzożowych aktywności celulaz stanowiły około 60% aktywności stwierdzonej w hodowli ze słomą pszeną, natomiast gdy zostały użyte trociny sosnowe, aktywność FPU wynosiła zaledwie 20% aktywności ze słomą.

O stymulującym działaniu krystalicznej celulozy na wydzielanie enzymów wspominali w swojej pracy Bujak i wsp. (3), stąd wprowadzano do hodowli zawierającej jako źródło węgla słomę pszeną i sproszkowaną celulozę MN-300. Celuloza ta w stosowanej ilości 0,25, 0,50 i 0,75% w stosunku do substratu przy zachowaniu proporcji 1:3 nie wpływała w przeważającej ilości prób na wzrost aktywności FPU, w niektórych kombinacjach aktywność celulaz była wyższa o 10–20%. Stwierdzono natomiast podwyższoną o 20 do 50% – w stosunku do prób z samą słomą – aktywność β -glukozydazy w hodowlach zawierających 2% i 3% słomy z celulozą.

Można zatem stwierdzić, że wstępnie przygotowana słoma wg metody podanej w tym opracowaniu, ma zbliżone właściwości w indukcji celulaz przez *T. reesei*, jak czysta celuloza MN-300.

Użycie do biosyntezy celulaz substratów lignocelulozowych w znacznym stopniu przyczynia się do obniżenia kosztów produkcji preparatów celulolitycznych.

Wnioski

1. Spośród przebadanych mutantów *Trichoderma reesei*, M₁ wykazywał najwyższą aktywność celulolityczną – 3,4 FPU po 8 dobach hodowli w podłożu zawierającym 3% słomy pszennej.

2. Dodatek sproszkowanej celulozy (MN-300) wpływał w nieznacznym stopniu na wzrost aktywności FPU (do 20%).

3. Wprowadzenie do podłoża zawierającego 2,25% słomy – 0,75% sproszkowanej celulozy, wpłynęło na podwyższenie aktywności β -glukozydazy od 20 – do 50% w stosunku do aktywności w pożywce ze słomą.

4. Wstępnie przygotowane trociny brzożowe okazały się słabszym niż słoma induktorem celulaz w hodowlach *T. reesei* (aktywność FPU stanowiła 0,5–0,6 aktywności uzyskanej dla słomy).

Literatura

1. Acebal C., (1986), Appl. Microbiol. Biotechnol., 24, 3, 218–223.
2. Bludovsky R., Duchacek V., (1979), Prum. Potravin, 30, 9, 534–535.
3. Bujak S., Baraniak A., Targoński Z., (1985), Dokumentacja pracy: „Podstawowe badania enzymatycznej degradacji surowców celulozowych i lignocelulozowych”, MR II 15, Akademia Rolnicza, Lublin.
4. Chabal D. S., Mc Guire S., Pikor H., Noble G., (1982), Biomass, 2, 127–137.
5. Mandels M., Weber J., Andreotti R., Roche C., (1976), Biotechnol. Bioeng., 6, 21.
6. Sinicyan A. P., Klesow A. A., (1981), Prikl. Bioch. i Mikrobiol., 17, 5, 682–693.
7. Sternberg D., (1976), Enz. Conver of Cell. Mat, Technol. and Appl., 6, 35–50.
8. Tangnu S. K., Blanch H. W., Wilke C. R., (1981), Biotechnol. Bioeng., 23, 1837–49.
9. Targoński Z., (1985), Acta Biotechnol., 5, 385.
10. Targoński Z., (wyniki nie publikowane).
11. Ghose T. K., (1987), Pure Appl. Chem., 59, 257.

The application of wheat straw and saw-dusts to cellulase biosynthesis by *Trichoderma reesei* mutants

Summary

In biosynthesis of cellulase using *T. reesei* QM 9414 and its mutants, wheat straw and saw-dusts from birch and common pine were applied. These substrates after milling were pretreated thermally under pressure and chemically 1, 2, and 3% wheat straw and 1% saw-dusts were used. In the medium containing wheat straw cellulose MN-300 was added at the ratio of 3:1. The highest activity of 3,4 FPU was obtained using mutant-M₁ after 8 days of cultivation in the medium containing 3% wheat straw.

Addition of cellulose had a minimal effect on the level of FPU activity, but increased the β -glucosidase activity. Saw dusts were weaker inductor than wheat straw in cellulase cultivation of *T. reesei*.

Adres dla korespondencji:

Eugenia Podgórska, Katedra Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa, Akademia Rolnicza, ul. Akademicka 13, 20–934 Lublin.