

Zdzisław Targoński

Katedra Technologii Przemysłu  
Rolno-Spożywczego  
i Przechowalnictwa,  
Akademia Rolnicza  
Lublin

## Biosynteza celulaz, ksylanaz i enzymów litycznych przez *Trichoderma reesei* QM 9414 i *Trichoderma viride* F-19

### 1. Wprowadzenie

Do jednych z najintensywniej badanych enzymów należą celulazy. Wiąże się to z ich praktycznym zastosowaniem w hydrolizie celulozy do glukozy. Celulazy są wieloskładnikowym kompleksem enzymatycznym zawierającym 3 podstawowe typy enzymów, działających synergistycznie, tj.  $\text{exo-}\beta\text{-1,4}$ -glukanazy,  $\text{endo-}\beta\text{-1,4}$ -glukanazy i  $\beta$ -glukozydazy (1). Jednymi z najlepszych producentów enzymów celulolitycznych o znaczeniu przemysłowym są szczepy z rodzaju *Trichoderma*, a w szczególności takie gatunki jak: *T. reesei* QM 6a i jej mutanty (2), *Trichoderma harzianum* (3), *T. koningi* (4), *T. viride* (5). Celulazy nie należą jednak do jedynych enzymów wydzielanych do podłoża hodowlanego przez ww. gatunki. Duże znaczenie w hydrolizie biomasy roślinnej odgrywają ksylanazy, arabanazy, pektynazy, amylazy, które są często syntetyzowane obok celulaz. Ważną rolę odgrywają także enzymy lityczne, tj.  $\beta\text{-1,3}$ -glukanazy, chitynazy i proteazy oddziałujące na ściany komórkowe grzybów, drożdży, a wykrywane w filtratach wielu szczepów z rodzaju *Trichoderma*. Enzymy te mogą wpływać na przebieg hodowli mieszanych z udziałem innych szczepów. Przykładem może być łączna hodowla *T. reesei* C-30 i *Aspergillus phoenicis* (6) w celu otrzymania pełnego kompleksu enzymów celulolitycznych bogatego w celobiazę. Obecność enzymów litycznych w surowych preparatach celulolitycznych wpływa na przebieg procesu łącznego scukrzania materiałów lignocelulozowych i etanolowej fermentacji z wykorzystaniem drożdży (7).

Preparaty celulolityczne zawierające kompleks enzymów litycznych mogą zakłócać przebieg wymienionych procesów w wyniku lizy ścian komórkowych drożdży i grzybów. Jednakże enzymy lityczne okazują się niezwykle pomocne w pozyskiwaniu protoplastów, degradacji glonów, klarowania piwa i wina (hydroliza  $\beta\text{-1,3}$ -glukanów) itp.

Celem pracy było przebadanie biosyntezy enzymów celulolitycznych, ksylanolitycznych, chitynazy i  $\beta\text{-1,3}$ -glukanazy przez dwa szczepy będące potencjalnymi producentami przemysłowymi preparatów celulolitycznych, tj. *T. reesei* QM 9414 i *T. viride* F-19.

### 2. Materiały i metody

#### Mikroorganizmy i warunki hodowli

Szczep *T. reesei* QM 9414 otrzymano z Czechosłowackiej Kolekcji Mikroorganizmów w Brnie, a szczep *T. viride* F-19 pochodził z kolekcji kultur Katedry Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa AR w Lublinie.

Szczepy przechowywano na skosach brzeczkowo-agarowych w temp. 2°C. Podłoże do hodowli składało się z następujących składników:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4 g/l;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g/l;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g/l; mocznik, 0,15 g/l;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,4 g/l; ekstrakt drożdżowy (Diffco), 1 g/l; peptobak, 1 g/l; Tween 80, 0,5 g/l; mikroelementy wg Mandels, Weber (8), pH pożywki doprowadzono do 5,5 kwasem fosforowym. Jako źródła węgla używano: celulozę MN-300 (Macherey-Nagel Co), ksylan (Fluka), chitynę (Fluka), grzybnię z *Aspergillus niger* otrzymaną po hodowli na glukozie jako źródła węgla. Hodowle szczepów z rodzaju *Trichoderma* prowadzono w kolbach stożko-

wych o pojemności 500 ml ze 100 ml pożywki hodowlanej na wyrząsarce rotacyjnej o 220 obr/min w temp. 28°C, chyba że podano inaczej. Pożywkę szczepiono grzybnią w ilości znajdującej się na 0,5 cm<sup>2</sup> powierzchni skosu brzeżkowego. Po hodowli grzybnię dwirowano, a filtrat pohodowlany poddano badaniom.

### Oznaczenie aktywności enzymatycznych

Aktywność celulolityczną FPU i celobiazy filtratu pohodowlanego oznaczano metodami podanymi przez IUPAC (9).

Aktywność ksyłanolityczną określano w sposób następujący: 50 mg ksyłanu (Fluka) zadawano 0,9 ml buforu octanowego o pH 4,8, 0,05 M i dodawano 0,1 ml filtratu pohodowlanego. Po 1 godzinie inkubacji w temp. 50°C, oznaczano w mieszaninie cukru redukujące w reakcji z kwasem 3,5 dwunitrosalicylowym (10). Aktywność wyrażano w  $\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$ .

Do oznaczenia aktywności  $\beta$ -1,3-glukanazy wykorzystano  $\beta$ -1,3-glukan otrzymany z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wg metody podanej przez Mannersa i wsp. (11). Mieszaninę o następującym składzie: 0,5 ml suspensji  $\beta$ -1,3-glukanu o stężeniu 6,5 g/l, 0,4 ml buforu octanowego 0,05 M o pH 4,8 i 0,1 ml filtratu pohodowlanego inkubowano w temp. 40°C przez 1 godz. Ilość powstałych cukrów redukujących oznaczano w reakcji z kwasem 3,5 dwunitrosalicylowym (10). Aktywność wyrażano w  $\mu\text{mol}$  powstałych cukrów redukujących/ ml  $\times$  min.

Aktywność chitynazy oznaczano wobec chityny koloidalnej otrzymanej wg metody podanej przez Lunta i Kenta (12).

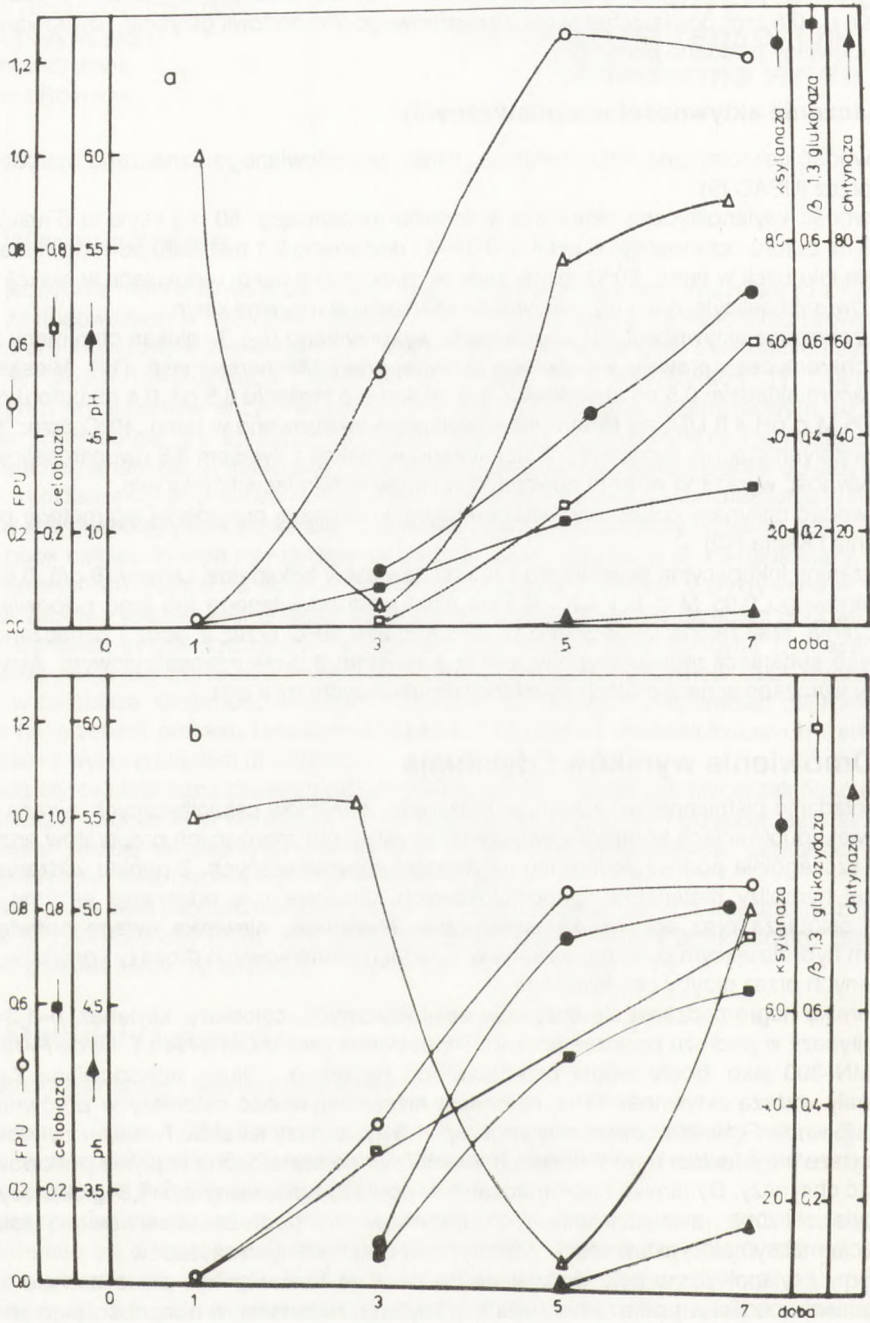
Mieszanina inkubacyjna składała się z 0,5 ml zawiesiny koloidalnej chityny (6 g/l), 0,5 ml buforu octanowego 0,05 M o pH 4,8 i 0,5 ml filtratu pohodowlanego lub jego odpowiedniego rozcieńczenia. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 40°C przez 2 godz i oznaczano ilości powstałych substancji redukujących w reakcji z kwasem 3,5-dwunitrosalicylowym. Aktywność chitynazy wyrażano w nanomolach substancji redukujących/ ml  $\times$  min.

### 3. Omówienie wyników i dyskusja

Przeglądając piśmiennictwo z zakresu biosyntezy enzymów celulolitycznych zwraca uwagę brak w wielu publikacjach kompleksowej charakterystyki otrzymywanych preparatów enzymatycznych, szczególnie pod względem ich aktywności enzymatycznych. Z punktu widzenia enzymatycznej hydrolizy materiałów lignocelulozowych kluczową rolę odgrywają enzymy celulolityczne, celobiaza oraz enzymy ksyłanolityczne. Natomiast, niewielką uwagę poświęca się enzymom hydrolizującym polimery zawarte w ścianach komórkowych drożdży i grzybów, a syntetyzowanych przez grzyby celulolityczne.

Dynamikę nagromadzania się enzymów celulolitycznych, celobiazy, ksyłanaz,  $\beta$ -1,3-glukanazy, chitynazy w podłożu podczas hodowli *Trichoderma reesei* QM 9414 i *T. viride* F-19 na celulozie MN-300 jako źródle węgla przedstawiono na rys. 1. Filtry pohodowlane *T. reesei* wykazywały wyższą aktywność FPU, natomiast niższą aktywność celobiazy w porównaniu do szczepu *T. viride* F-19. Natomiast aktywności  $\beta$ -1,3-glukanazy filtratów *T. reesei* były około 2-krotnie niższe niż *T. viride*, a po 7 dniach hodowli *T. viride* stwierdzono w płynie pohodowlanym obecność chitynazy. Dynamika nagromadzania w podłożu hodowlanym  $\beta$ -1,3-glukanazy i celobiazy była zbliżona, a wydzielanie tych enzymów do podłoża obserwowano także po osiągnięciu maksymalnej aktywności celulolitycznej obu badanych szczepów.

Enzymy ksyłanolityczne były wydzielane do podłoża hodowlanego przez badane szczepy pomimo nieobecności w podłożu hodowlanym ksyłanu. Natomiast, w obecności jego jako jedynego źródła węgla obserwowano zwiększone wydzielanie enzymów ksyłanolitycznych w stosunku do hodowli obu szczepów na celulozie MN-300 (tab. 1). Przedstawione w tab. 1 wyniki badań wpływu temperatury na biosyntezę ksyłanaz przez *T. reesei* potwierdzają doniesienia



Rys. 1. Zmiany w aktywności FPU, celobrazy, ksylanazy,  $\beta$ -1,3-glukonazy, chitynazy oraz pH filtratów otrzymanych z hodowli a) *T. reesei* QM 9414, b) *T. viride* F-19 na celulozie MN-300 jako źródle węgla.

Such i wsp. (13) o zwiększonej biosyntezie tych enzymów w temp. 37°C po 3-dobowej hodowli w porównaniu do temp. 25 i 30°C. Zwraca uwagę również fakt, że filtry pchodowlane otrzymane po namnożeniu *T. reesei* na ksylozie wykazywały niską aktywność celulozową. Obserwacje te mają istotne znaczenie przy produkcji preparatów enzymatycznych przez *T. reesei* na substratach lignocelulozowych i sterowaniu składem kompleksu enzymatycznego otrzymanego preparatu. W przypadku *T. viride* F-19 w temp. 37°C obserwowano słabe namnożenie grzybni i niewielkie wykorzystanie ksyłanu.

Tabela 1

**Aktywności enzymatyczne filtratów otrzymanych po hodowli**  
*T. reesei* QM 9414 i *T. viride* F-19 na pożywce z dodatkiem 0,5% ksyłanu

Szczep	Temperatura hodowli	Aktywność enzymatyczna filtratów pchodowlanych po dobach							
		3				6			
		FPU	ksylanaza	$\beta$ -1,3-glukanaza	chitynaza	FPU	ksylanaza	$\beta$ -1,3-glukanaza	chitynaza
<i>T. reesei</i> QM 9414	25	0,11	2,2	0,06	0,0	0,14	2,75	0,13	3,0
	30	0,07	2,4	0,06	0,0	0,12	3,65	0,16	5,0
	37	0,08	3,5	0,16	0,0	0,07	3,70	0,15	1,0
<i>T. viride</i> F-19	25	0,10	2,7	0,20	0,0	0,14	4,50	0,20	10,0
	30	0,05	2,7	0,18	0,0	0,07	4,65	0,18	5,0
	37	niewielkie namnożenie grzybni							

Aktywności FPU, ksylanazy i  $\beta$ -1,3-glukanazy wyrażono w  $\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$ , a chitynazy  $\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$ .

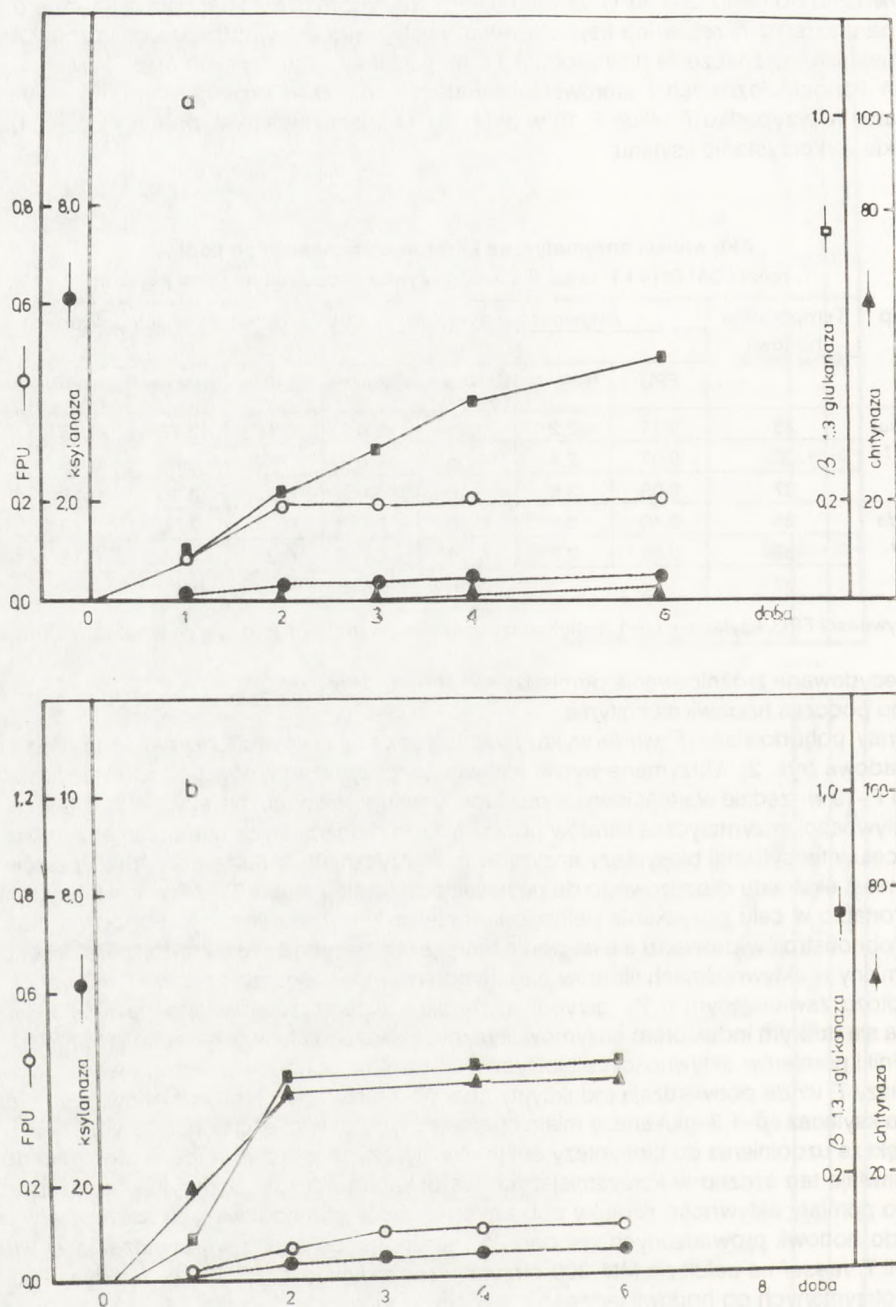
Zdecydowane różnicowanie pomiędzy szczepami *T. reesei* QM 9414 i *T. viride* F-19 obserwowano podczas hodowli na chitynie.

Filtry pchodowlane *T. viride* wykazywały wysokie aktywności chitynazy, natomiast *T. reesei* śladowe (rys. 2). Otrzymane wyniki aktywności chitynazy płynów pchodowlanych stawiają szczep F-19 w rzędzie wartościowych producentów tego enzymu. Należy zwrócić uwagę na niskie aktywności enzymatyczne filtratów pchodowlanych pozostałych badanych enzymów.

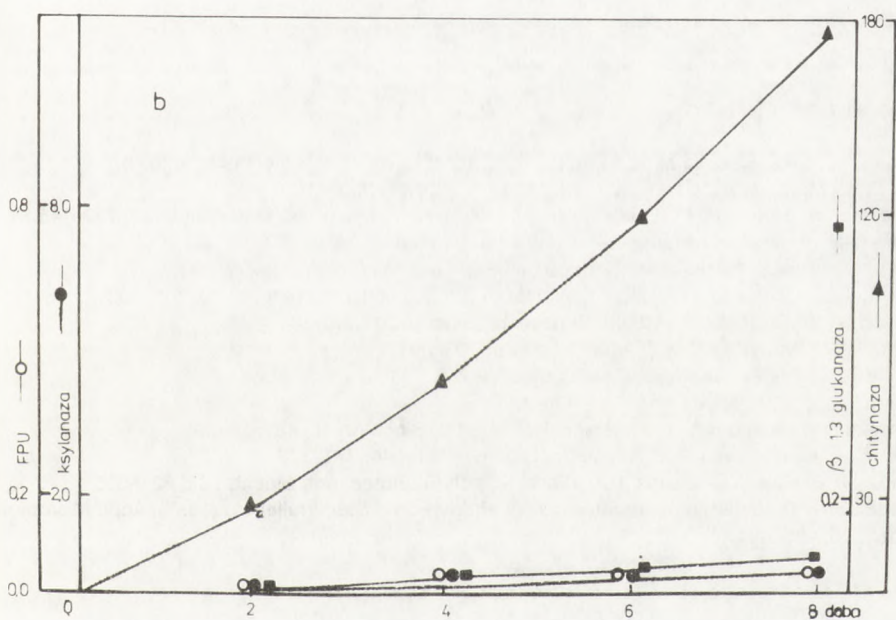
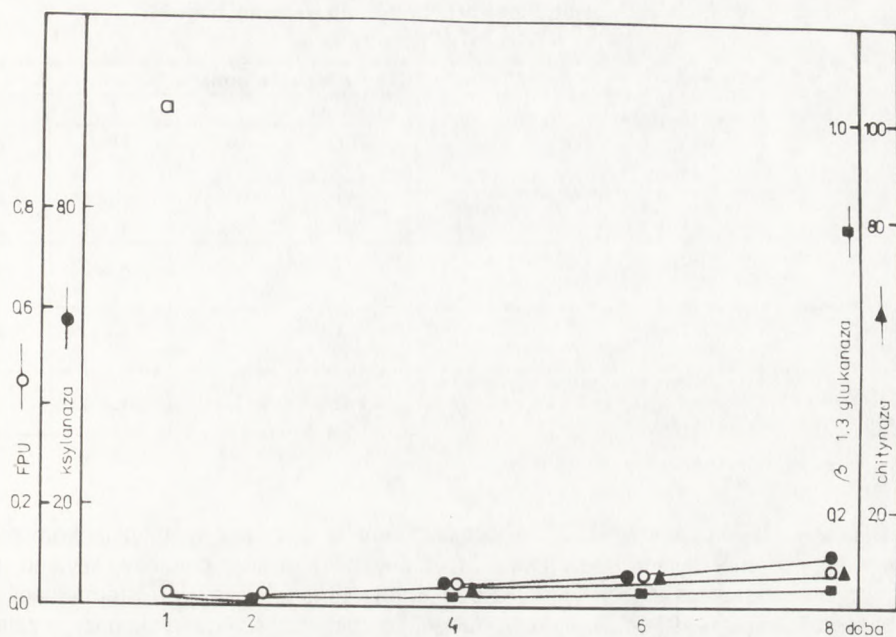
W celu intensyfikacji biosyntezy enzymów celulozowych, a także obniżenia kosztów pożywki zamiast ekstraktu drożdżowego do pożywek dodaje się grzybni *T. reesei* lub jej hydrolizatów (14). Ponadto w celu pozyskania pełnego kompleksu enzymów litycznych hodowlę odpowiednich drobnoustrojów prowadzi się na podłożach zawierających ściany komórkowe drobnoustrojów. Zmiany w aktywnościach filtratów badanych enzymów podczas hodowli *T. reesei* i *T. viride* na podłożu zawierającym 0,5% grzybni *Aspergillus niger* przedstawiono na rys. 3. Grzybnia okazała się dobrym induktorem enzymów litycznych szczególnie w przypadku *T. viride*.

Wyniki pomiarów aktywności celulozowych filtratów pchodowlanych badanych szczepów i chitynazy *T. viride* potwierdzają indukcyjny charakter biosyntezy tych enzymów, natomiast biosynteza ksylanazy i  $\beta$ -1,3-glukanazy miała charakter syntezy w części konstytucyjnej.

Większe uzdolnienia do biosyntezy enzymów litycznych przez *T. viride* w stosunku do *T. reesei* stawiają ten szczep w korzystniejszych warunkach podczas łącznej ich hodowli. Potwierdzają to pomiary aktywności filtratów pobranych z wspólnych hodowli tych szczepów w porównaniu do hodowli prowadzonych osobno. W zależności od czasu wprowadzania *T. viride* do hodowli *T. reesei* na celulozie MN-300 otrzymywano aktywności FPU bliższe aktywnościom filtratów otrzymanych po hodowli jednego z badanych szczepów (tab. 2). Tak też gdy oba szczepy wprowadzono do pożywki z celulozą równocześnie aktywność filtratu pchodowlanego była równa aktywności FPU otrzymanej po hodowli *T. viride*. Zarówno ten jak i pozostałe wyniki (tab. 2) wskazują na dominujący charakter *T. viride* w stosunku do *T. reesei*, co związane jest ze zwiększonymi uzdolnieniami syntezy chitynazy i  $\beta$ -1,3-glukanazy.



Rys. 2. Zmiany w aktywności FPU, ksylanazy,  $\beta$ -1,3-glukanazy i chitynazy filtratów otrzymanych z hodowli a) *T. viride* F-19, b) *T. reesei* QM 9414 na grzybnii *A. niger* jako źródle węgla.



Rys. 3. Zmiany w aktywności FPU, ksylanazy,  $\beta$ -1,3-glukanazy i chitynazy filtratów otrzymanych z hodowli a) *T. reesei* QM 9414 i b) *T. viride* F-19 na chitynie jako źródle węgla.

Aktywności celulołityczne i pH filtratów po wspólnej hodowli  
*T. reesei* QM 9414 i *T. viride* F-19.

Szczepy	Czas wprowadzenia do hodowli <i>T. viride</i> F-19	Czas hodowli w dobach						
		2		3		5		
		FPU	pH	FPU	pH	FPU	pH	
<i>T. reesei</i>	—	0,76	3,0	1,25	3,3	1,4	4,2	
<i>T. viride</i>	—	0,79	2,9	0,9	2,8	0,86	2,9	
<i>T. reesei</i> <i>T. viride</i>	+	0	3,0	0,9	3,1	0,86	3,7	
<i>T. reesei</i> <i>T. viride</i>	+	24	0,77	3,0	1,0	3,0	1,22	3,9
<i>T. reesei</i> <i>T. viride</i>	+	48	0,76	2,9	1,15	3,2	1,35	4,3

Aktywność FPU wyrażono w  $\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$ .

Podsumowując, należy stwierdzić, że szczep *T. reesei* QM 9414 syntetyzuje kompleks enzymów zewnątrzkomórkowych szczególnie przydatny do hydrolizy celulozy, ksylanu, w tym również do procesów łącznego scukrzania substratów lignocelulozowych i fermentacji. Natomiast, szczep *T. viride* F-19 jest cennym producentem chitynazy i  $\beta$ -1,3-glukanazy, a zatem enzymów odgrywających kluczową rolę w lisie ścian komórkowych grzybów.

Pracę wykonano w ramach programu CPBP 04.11.2.27.

## Literatura

- Enari T. M., Niku-Paavola M. L., (1987), CRC Critical Reviews in Biotechnol., 5, 67-87.
- Ryu D. D., Mandels M., (1980), Enzyme Microb. Technol., 2, 91-102.
- Saddler J. N., Hogan C. M., Louis-Seize G., (1985), Appl. Microbiol. Biotechnol., 22, 139-145.
- Wang C-H., Hsen T-H., Huang C-M., (1988), J. Biotechnol., 9, 47-60.
- Farkas V., Kerns G., Liskova M., Bauer S., (1986), Folia Microbiol., 31, 277-281.
- Duff S. J. B., Cooper D. G., Fuller O. M., (1986), Enzyme Microb. Technol., 8, 305-308.
- Szczodrak J., Targoński Z., (1988), Biotechnol. Bioeng. 31, 300-303.
- Mandels M., Weber J., (1969), Adv. Chem. Ser., 95, 391.
- Ghose T. K., (1987), Pure Appl. Chem., 59, 257-268.
- Miller G. L., (1959), Anal. Chem., 31, 426-428.
- Manners D. J., Masson A. J., Patterson J. C., (1973), Biochem. J., 135, 19-30.
- Lunt M. R., Kent P. W., (1960), Biochem. Biophys. Acta, 44, 371-373.
- Suh D. H., Becker T. C., Sands J. A., Bland S., (1988), Biotechnol. Bioeng., 32, 821-825.
- Doppelbauer R., Esterbauer H., Steiner W., Lafferty R. M., Steinmuller H., (1987), Appl. Microbiol. Biotechnol., 26, 485-494.

## The biosynthesis of cellulase, xylanase and lytic enzymes by *Trichoderma reesei* QM 9414 and *Trichoderma viride* F-19

### Summary

*Trichoderma reesei* QM 9414 and *T. viride* F-19 were cultivated in various media, and cellulase, xylanase and lytic enzymes (chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase) in the culture filtrate were measured. The lytic enzymes and chitinase were best produced by *T. viride* F-19 on the mycelium of *Aspergillus niger* and chitin, respectively. Low levels of chitinase in the extracellular culture fluids of *T. reesei* QM 9414 were detected. The ratio of cellulase to xylanase in the culture fluids of *T. reesei* QM 9414 varied with the nature of the carbon source and temperature.

### Adres dla korespondencji:

Zdzisław Targoński, Katedra Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa, Akademia Rolnicza, ul. Akademicka 13, 20-934 Lublin.

## NOWOŚCI!

### Neurony w hodowli *in vitro*

Dr S. Snyder z John Hopkins Medical School opracował metodę hodowli *in vitro* ludzkich neuronów, w której komórki te rosną i dzielą się. Praca uzyskała półmiliardową dotację firmy Bristol-Myers. Z punktu widzenia nauk podstawowych odkrycie to przyspieszy zasadniczo badania przyczyn chorób umysłowych, uzależnienia od leków, mechanizmów regulacji tkanki nerwowej. Natychmiast zauważono również aspekty praktyczne tego odkrycia, a negocjacje licencyjne prowadzi z Uniwersytetem Johna Hopkinsa firma Nova Pharmaceutical Corporation w Baltimore. Jest to na rynku amerykańskim przodująca firma testująca i produkująca leki neuroaktywne. Sądzi się również, że możliwe będzie przygotowanie *in vitro* tkanki do wszczepiania do mózgu. Terapia ta proponowana jest dla osób dotkniętych chorobą Parkinsona i Alzheimera. Firma rozpoczęła również badania skuteczności leczenia neuronów zakażonych HIV.

M.F.

Opracowano na podstawie: (9 July, 1990), The Scientist.

### Szczepionki w weterynarii

W najbliższym dziesięcioleciu wartość sprzedawanych na świecie szczepionek przeciw chorobom zwierząt zwiększy się z 870 tys. do 1 miliarda USD. Sądzi się, że ten lawinowy przyrost nastąpi dzięki rosnącemu rynkowi w krajach Europy Wschodniej, a także zastosowaniu wielu nowych technologii produkcyjnych. Szczepionki opracowuje się obecnie przeciw ponad 100 chorobom zwierzęcym, a pracą tą zajmuje się co najmniej 350 firm na świecie.

M.F.

Opracowano na podstawie: (1990), Feedstuffs, 62, 15, 10.