



Wpływ wybranych monosacharydów na biosyntezę celulaz, ksylanaz i enzymów litycznych przez mutantą *Trichoderma reesei* M-7

Piotr Janas, Zdzisław Targoński, Stanisław Mleko

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

The effect of xylose, galactose and sorbose on the production of selected extracellular enzymes by mutant-strain *Trichoderma reesei* M-7 during continuous cultivation

Summary

The effect of xylose, galactose and sorbose on the production of cellulases, xylanases, lytic enzymes and β -galactosidase by mutant – strain *Trichoderma reesei* M-7 was analysed. The aforementioned sugars were used separately and in the form of mixtures with lactose as the source of carbon during continuous cultivation of mutant M-7. Feeding medium containing mixtures of xylose and lactose in the ratio of 0.25/0.75% and 0.5/0.5% induced an increased synthesis of xylanases. Increased xylanolytic activity (about 12-27%) with the xylose/glucose ratio of 0.25/0.75% and a significantly increased activity (about 2.5 fold) with the ratio of both sugars of 0.5/0.5% was observed in comparison with continuous cultivation in the presence of 1% of lactose in the medium. Reduced synthesis of all cellulolytic (FPU, β -1,4-endoglucanase, β -glucosidase) and xylanolytic enzymes correlated with the increased galactose concentration in the feeding medium. Galactose also repressed the production of β -galactosidase of the mutant-strain M-7. The results obtained after continuous cultivation with sorbose and lactose showed that sorbose was a worse inducer of synthesis of cellulolytic enzymes than lactose.

Key words:

cellulases, lytic enzymes, continuous cultivation, inducer, *Trichoderma reesei*, xylanases.

Adres do korespondencji

Piotr Janas,
Katedra Technologii
Przemysłu
Rolno-Spożywczego
i Przechowalnictwa,
Akademia Rolnicza,
ul. Skromna 8,
20-950 Lublin,
e-mail: piojan2@wp.pl

1. Wprowadzenie

Wykorzystanie energii zakumulowanej w biomase ligninocelulozowej wymaga jej konwersji do form przyswajalnych. Chemiczna hydroliza tego substratu stwarza ryzyko zanieczyszczenia środowiska. Dlatego też od wielu lat uwaga badaczy koncentruje się na enzymach rozkładających celulozę do glukozy, tj. celulazach. Jednymi z najlepszych producentów enzymów celulolitycznych o znaczeniu przemysłowym okazały się grzyby z rodzaju *Trichoderma* (Deuteromycetes), a w szczególności *Trichoderma reesei* QM6a i jego mutanty. Celulazy nie są jednak jedynymi enzymami obecnymi w filtratach pochodzących wymienionych gatunków. Duże znaczenie w hydrolizie biomasy roślinnej odgrywają ksylanazy, arabanazy, pektynazy i amylazy, które są często syntetyzowane obok celulaz. Ważną rolę odgrywają także enzymy lityczne, tj. β -1,3-glukanazy, chitynazy i proteazy oddziałujące na ściany komórkowe grzybów i drożdży. Ich obecność w filtratach pochodzących może wpływać niekorzystnie na wzrost i zdolności produkcyjne komórek. Jednak hydroliza enzymatyczna ścian komórkowych okazuje się niezwykle pomocna w otrzymywaniu enzymów wewnątrzkomórkowych, badaniach nad strukturą ściany komórkowej, a także do otrzymywania protoplastów wykorzystywanych następnie do transformacji i inżynierii genetycznej (1).

Pomimo wyizolowania, klonowania i zsekwencjonowania 4 genów kodujących główne celulazy *T. reesei* CBH I (2), CBH II (3), EG I (4) i EG II (5) dalsze zwiększenie produkcji celulaz i bardziej efektywne sterowanie składem kompleksu celulolitycznego, a tym samym stworzenie nowych możliwości zastosowania tych enzymów w praktyce, jak się wydaje, wymaga poznania mechanizmów regulacji ich produkcji i sekrecji. Podstawowe pytanie dotyczące regulacji produkcji celulaz zostało postawione już ponad 40 lat temu przez Mandels i Reese (6). Do tej pory nie znaleziono jednoznacznej odpowiedzi jak wysoko spolimeryzowany nierozpuszczalny substrat jakim jest celuloza powoduje indukcję produkcji celulaz i w jaki sposób sygnał inicjacji transkrypcji genów celulazowych wnika do wnętrza komórki. Zastosowanie w ostatnich latach technik immunologicznych z udziałem przeciwciał mono- i poliklonalnych przeciw poszczególnym składnikom kompleksu celulolitycznego *T. reesei* okazało się dobrym narzędziem do identyfikacji oraz ilościowego oznaczania bardzo małych stężeń tych enzymów (7,8). Umożliwiło to dostarczenie pośrednich dowodów na istnienie konstytutywnych celulaz na powierzchni mycelium i konidiów grzyba, które działając na celulozę mogą uwalniać oligosacharydy będące potencjalnymi sygnałami inicjującymi transkrypcję genów celulazowych (9-11). Interesującą cechą kompleksu celulolitycznego związanego z konidiami *T. reesei* jest dominacja w jego składzie celobiohydrolazy II (dwukrotnie większy udział niż celobiohydrolazy I) i brak endoglukanazy I (10). Dla przypomnienia proporcje ilościowe celobiohydrolaz I i II wydzielanych przez grzyba do podłoża hodowlanego są odwrotne (12). Świadczy to o roli celobiohydrolazy II w inicjacji rozkładu celulozy oraz może wskazywać na istnienie specyficznego sygnału powodującego podwyższenie ekspresji

białka tego enzymu w czasie konidiogenezy (13). Przypuszczenie to częściowo potwierdza również fakt zwiększonej ilości celobiohydrolazy II związanej z komórkami u hipersekrecyjnych mutantów *T. reesei* przy niezmienionym poziomie celobiohydrolazy I (14). Rekombinanty o zwielokrotnionej liczbie kopii genów celobiohydrolazy II cechuje zwiększenie produkcji celulaz w obecności celulozy (15). Natomiast inaktywacja genu *cbh 2* nie powoduje zahamowania wzrostu grzyba podczas hodowli na celulozie, lecz tylko wydłużenie fazy wstępnej (inicjacji) rozkładu celulozy (13).

W praktyce w celu obniżenia kosztów produkcji celulaz w miejsce stosowanych czystych substratów celulozowych, tj. Avicel, Solca Floc czy pulpy drzewne, stosuje się obecnie łatwo dostępne i wygodne do zastosowania podczas hodowli grzybów cukry: laktozę, celobiozę, soforozę, sorbozę czy ich pochodne, np. kwas celobionowy i jego lakton.

Celobioza jest rozpuszczalnym produktem rozkładu celulozy stąd logiczna, jak się wydaje, jest jej funkcja induktora produkcji enzymów celulolitycznych. Jest tak rzeczywiście (6), przy czym efekt indukcyjny uzależniony jest od szczepu grzyba i warunków hodowli. Hodowle *T. reesei* prowadzone w obecności celobiozy lub dodatek tego cukru do podłoża z celulożą nie powodował indukcji, a nawet hamował produkcję celulaz. Jednocześnie powolne zasilanie hodowli pożywką z celobiozą jako jedynym źródłem węgla lub zablokowanie hydrolizy tego cukru przez zewnątrzkomórkową β -glukozydazę prowadzi do biosyntezy celulaz w ilościach podobnych jak w obecności celulozy (16). Do induktorów celulaz należy również: soforoza i lakton kwasu celobionowego (17-19). Niskie stężenie obydwu substratów stwierdzono w filtratach *T. reesei* podczas hodowli w obecności celulozy (20). Soforoza może powstawać w reakcji transglukozyzacji katalizowanej przez β -glukozydazę lub endoglukanazę I. Indukcyjny wpływ tego cukru jest związany z bardzo małym powinowactwem β -glukozydazy w stosunku do tego substratu (21,22). Potwierdza to również fakt najwyższego działania indukcyjnego soforozy przy pH 3, przy którym aktywność β -glukozydazy jest bliska zeru (21). Wśród innych rozpuszczalnych substratów indukujących produkcję celulaz na uwagę zasługują: laktoza i sorboza. Pierwsza, m.in. ze względu na jej wysoką zawartość w serwatce – produkcie ubocznym mleczarni. Aktywności celulolityczne uzyskiwane podczas hodowli w obecności tego cukru są jednak znacznie niższe niż w obecności czystych substratów celulozowych. Natomiast L-sorboza jest jedynym do tej pory znanym cukrem prostym – induktorem celulaz *T. reesei* (23,24).

Zwiększona aktywność niektórych enzymów podczas przeprowadzonej przez nas hodowli ciągłej mutantu M-7 *T. reesei* przy odpowiednich stężeniach laktozy i glukozy w pożywce zasilającej (25) wzbudziła zainteresowanie potencjalnym, indukcyjnym efektem dodatku innych cukrów prostych do podłoża hodowlanego z laktozą. Testowane trzy cukry proste: ksyloza, sorboza i galaktoza były w połączeniu z laktozą i oddzielnie, stosowane jako źródła węgla podczas hodowli ciągłej badanego szczepu w temperaturze 26°C i przy pH 4,0.

2. Materiały i metody

W badaniach stosowano następujące odczynniki chemiczne: laktozę jednowodną, salicynę, azokazeinę, chitynę, laminarynę, kwas 3,5-dinitrosalicylowy, ksylan z brzozy, β -o-nitrofenylo galaktozyd (Sigma, St. Luis, USA), ekstrakt drożdżowy BTL (Łódź, Polska), bibułę filtracyjną Whatman nr 1 (Whatman Ltd., Maidstone, Anglia). Pozostałe odczynniki pochodziły z firmy POCh (Gliwice, Polska)

Mikroorganizm: w badaniach wykorzystano mutanta *Trichoderma reesei* o symbolu M-7 – wyselekcjonowanego po mutagenizacji promieniami UV *T. reesei* QM 9414 w Katedrze Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa Akademii Rolniczej w Lublinie. Mutanta przechowywano na skosach brzezkowych w temperaturze 2°C, okresowo go przeszczepiając.

Hodowle: do hodowli ciągłych *T. reesei* M-7 w obecności rozpuszczalnych źródeł węgla wykorzystano bioreaktor Bioflo III o pojemności 5 dm³. Bioreaktor napełniono pożywką mineralną wg Mandels i Weber (26) z dodatkiem 1% laktozy, sterylizowano przy 0,05 MPa przez 30 minut i szczepiono wcześniej przygotowanym inokulum w ilości 200 cm³. Inokulum otrzymano przez zaszczerpienie kolb Erlenmeyera o pojemności 500 cm³ zawierających po 100 cm³ pożywki mineralnej wg Mandels i Weber (26) o pH = 5,0, z dodatkiem 1% laktozy, zawiesiną konidiów *Trichoderma reesei* M-7 o stężeniu $2 \times 10^7/\text{cm}^3$ i inkubację przez 72 godziny na wytrząsarce rotacyjnej (250 rpm) w temperaturze 28°C. Hodowle fermentorowe prowadzono przy stałym pH = 4,0 regulowanym przy użyciu 5% NH₄OH i 2,5% H₃PO₄ i w temperaturze 26°C. Po wyczerpaniu laktozy w podłożu uzupełniano je w sposób ciągły z szybkością 2 cm³/min pożywką mineralną wg Mandels i Weber (26), z dodatkiem laktozy w stężeniu 1% lub 1% mieszaniną laktozy i galaktozy, ksylozy, sorbozy. Stosunki laktozy do cukrów prostych były następujące: 0,75:0,25%; 0,5:0,5%; 0,25:0,75%. Ponadto przeprowadzono hodowle w systemie ciągłym stosując pożywki zawierające wyłącznie jeden z wymienionych związków w stężeniu 1%. Przez cały czas hodowli następował ciągły, nadmiarowy odbiór zawiesiny hodowlanej z bioreaktora. Poszczególne cykle hodowli ciągłej prowadzono przez 4-5 dób, przy stałej szybkości rozcieńczenia $D = 0,024 \text{ h}^{-1}$, pozwalającej utrzymać śladowe ilości cukrów w podłożu.

Oznaczanie aktywności enzymów: aktywność celulaz (FPU) oznaczano wg Mandels i wsp. (27) i wyrażano w jednostkach międzynarodowych ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) jako aktywność wobec bibuły filtracyjnej Whatman nr 1 (Whatman Ltd). Aktywność β -glukozydazy płynu pohodowlanego oznaczono metodą podaną przez IUPAC (28). Aktywność endo- β -1,4-glukanazy oznaczono wg metodyki podanej przez Targońskiego i Szajera (29). Aktywność ksylanolityczną określano następująco: do 50 mg ksylanu (Sigma) dodawano 0,9 cm³ buforu octanowego o pH 4,8 i 0,1 cm³ rozcieńczonego płynu pohodowlanego. Po 30 minutach inkubacji w temperaturze 50°C oznaczano w mieszaninie cukry redukujące w reakcji z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym (30). Aktywność ksylanolityczną wyrażano w $\mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$. Aktywność pro-

teaz oznaczano wobec azokazeiny (Sigma), jak podali Lovrien i wsp. (31). Aktywność enzymatyczną chitynazy oznaczano wobec chityny koloidalnej, którą otrzymywano z chityny natywnej (Sigma) (32). Reakcję enzymatyczną przeprowadzano inkubując 0,5 cm³ roztworu chityny z 0,5 cm³ płynu pohodowlanego przez 60 min i oznaczając cukry redukujące po zagotowaniu mieszaniny z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym. Aktywność wyrażano w nanomolach substancji redukujących/cm³ × min. Do oznaczania aktywności β-1,3-glukanazy używano laminaryny (Sigma) (33). Aktywność tego enzymu wyrażano w ilości uwolnionych μmoli cukrów redukujących przez 1 cm³ preparatu enzymatycznego w ciągu 1 minuty po inkubacji 0,9 cm³ roztworu substratu z 0,1 cm³ płynu pohodowlanego w czasie 30 minut i temperaturze 50°C i reakcji z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym. Oznaczenie aktywności β-galaktozydazy przeprowadzono wg Colowick i Kaplan (34) używając 0,1 M buforu octanowego o pH 4,8 zamiast 0,2 M fosforanu sodowego. Pozostałe warunki reakcji enzymatycznej nie uległy zmianie. Zawartość białka oznaczano metodą wg Lowry i wsp. (35). Masę grzybni w bioreaktorze oznaczano po odwirowaniu i przemyciu próbek wodą destylowaną metodą suszarkową, w 105°C.

3. Wyniki

Zmiany aktywności enzymów ksylanolitycznych w filtratach otrzymanych po hodowli ciągłej mutantu M-7 zasilanej pożywką z laktozą i ksylozą w temperaturze 26°C były podobne jak podczas hodowli ciągłej w 30°C w obecności laktozy i glukozy (25). W obydwu przypadkach dodatek cukru prostego do pożywki powodował indukację produkcji ksylanaz. Zaobserwowano 12-27% wzrost aktywności enzymatycznej ksylanaz w filtratach po hodowli *T. reesei* M-7 w podłożu zawierającym 0,25% ksylozy i 0,75% laktozy i aż 2,5-krotne jej podwyższenie w obecności tych samych cukrów, ale zmieszanych w równych stosunkach (0,5 : 0,5%) (tab. 1). Zainteresowanie budzi fakt, że aktywność ta była tylko minimalnie niższa przy wyższych, 0,75 i 1%, stężeniach ksylozy w pożywce zasilającej. Inaczej niż podczas hodowli ciągłych w obecności glukozy, ksyloza wpływała na aktywności enzymów celulolitycznych produkowanych przez mutantu M-7. Zarówno aktywności obydwu składników kompleksu, tj. β-1,4-endoglukanazy i aryl-β-glukozydazy jak i niespecyficzna aktywność FPU były coraz niższe gdy wzrastało stężenie ksylozy w podłożu hodowlanym. Dodatek ksylozy do podłoża podczas hodowli ciągłej mutantu M-7 nie wpływał na produkcję chitynaz i β-1,3-glukanaz. Aktywność obydwu grup enzymów autolitycznych utrzymywała się na stałym poziomie w obecności wszystkich kombinacji mieszanin cukrów stosowanych jako źródło węgla. Zaobserwowano natomiast prawie dwukrotne zwiększenie aktywności enzymów proteolitycznych, która osiągnęła swoje maksimum przy 0,5% stężeniach ksylozy i laktozy. Dalsze zwiększenie zawartości ksylozy do 1% spowodowało obniżenie aktywności enzymatycznych proteaz do wartości wyjściowej oznaczonej podczas hodowli w obecności 1% laktozy. Tym m.in.

Tabela 1

Plon biomasy oraz stężenie białka i aktywność enzymatyczna filtratów pochodzących z hodowli ciągłej *Trichoderma reesei* M-7 w temperaturze 26°C przy różnych stężeniach laktozy i ksylozy

| Czas hodowli (doby) | Stosowanie stężenia laktozy/ksyloza (%) | Biomasa (mg/cm ³) | Białko (mg/cm ³) | Aktywność enzymatyczna filtratów pochodzących | | | | | | | |
|---------------------|---|-------------------------------|------------------------------|---|--|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--|---|--------------------------------------|
| | | | | FPU (μM/cm ³ × min) | β-1,4-endoglikanaza (U/cm ³) | β-glukozydaza (μM/cm ³ × min) | ksylanaza (μM/cm ³ × min) | chitynaza (nM/cm ³ × min) | β-1,3-glukanaza (μM/cm ³ × min) | proteaza (U/cm ³ × 10 ³) | β-galaktozydaza (U/cm ³) |
| 1 | | 3,56 | 1,55 | 0,97 | 18,52 | 0,125 | 14,36 | 24,71 | 1,62 | 6,54 | 0,073 |
| 3 | 1/0 | 3,68 | 2,15 | 1,11 | 22,41 | 0,152 | 27,18 | 21,55 | 1,72 | 8,71 | 0,084 |
| 4 | | 3,72 | 2,32 | 1,09 | 24,38 | 0,148 | 23,36 | 19,64 | 2,15 | 10,11 | 0,089 |
| 5 | | 3,82 | 2,21 | 1,17 | 25,71 | 0,161 | 25,12 | 22,17 | 2,11 | 9,85 | 0,099 |
| 6 | | 3,97 | 1,95 | 0,91 | 23,81 | 0,157 | 33,95 | 21,34 | 2,32 | 11,13 | 0,081 |
| 7 | 0,75/0,25 | 4,05 | 1,81 | 0,82 | 21,36 | 0,148 | 29,7 | 23,71 | 2,21 | 12,64 | 0,076 |
| 8 | | 3,81 | 1,75 | 0,71 | 19,21 | 0,125 | 28,33 | 24,18 | 2,23 | 15,40 | 0,069 |
| 9 | | 3,87 | 1,72 | 0,75 | 18,54 | 0,127 | 31,21 | 22,71 | 2,27 | 18,32 | 0,071 |
| 10 | | 4,11 | 1,71 | 0,67 | 17,65 | 0,12 | 44,17 | 21,44 | 1,83 | 17,40 | 0,063 |
| 11 | 0,5/0,5 | 3,97 | 1,76 | 0,65 | 14,34 | 0,11 | 63,03 | 19,75 | 2,06 | 18,00 | 0,053 |
| 12 | | 4,15 | 1,9 | 0,57 | 14,51 | 0,095 | 61,30 | 23,81 | 2,22 | 18,66 | 0,049 |
| 13 | | 4,21 | 1,85 | 0,58 | 13,81 | 0,087 | 62,71 | 22,15 | 2,21 | 17,00 | 0,043 |
| 14 | | 4,32 | 1,30 | 0,52 | 12,90 | 0,071 | 60,42 | 19,85 | 2,17 | 16,71 | 0,047 |
| 15 | 0,25/0,75 | 4,47 | 1,25 | 0,47 | 11,42 | 0,041 | 56,91 | 20,52 | 2,03 | 17,01 | 0,032 |
| 16 | | 4,32 | 1,24 | 0,39 | 10,95 | 0,027 | 58,24 | 21,44 | 2,11 | 16,48 | 0,039 |
| 17 | | 4,53 | 1,27 | 0,37 | 10,17 | 0,031 | 55,16 | 20,58 | 2,13 | 17,00 | 0,038 |
| 18 | | 4,47 | 1,10 | 0,25 | 5,31 | 0,011 | 54,42 | 23,72 | 2,15 | 14,50 | 0,030 |
| 19 | 0/1 | 4,42 | 0,96 | 0,19 | 7,18 | 0,009 | 53,82 | 22,51 | 2,23 | 12,35 | 0,034 |
| 20 | | 4,55 | 0,88 | 0,11 | 3,51 | 0,010 | 52,62 | 24,74 | 2,18 | 10,65 | 0,028 |
| 21 | | 4,68 | 0,90 | 0,10 | 0,415 | 0,008 | 53,51 | 22,82 | 2,13 | 11,04 | 0,028 |

wynikającym z braku kompensacji działaniem enzymów litycznych można wytłumaczyć zwiększony plon biomasy tego mutantu przy 0,75 i 1% stężeniach ksylozy.

Inne niż przypuszczano wyniki otrzymano po hodowli w obecności galaktozy. Zwiększenie stosunku stężenia tego cukru do laktozy w mieszaninie powodowało obniżenie oznaczanych aktywności celulolitycznych (FPU, β -1,4-endoglukanazy i aryl- β -glukozydazy) i ksylanolitycznych. Galaktoza wywierała również represyjny wpływ na produkcję β -galaktozydazy przez mutantu M-7. Wśród enzymów autolitycznych zaobserwowano tylko zwiększenie aktywności β -1,3-glukanazy z $2,25 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$ do $4,41$ - $4,56 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$ w obecności 1% galaktozy. Produkcja dwóch pozostałych enzymów: chitynazy i proteazy była podobnie jak innych enzymów zmniejszona przy wyższych stężeniach cukru prostego w pożywce zasilającej (tab. 2).

Kolejny cukier prosty, tj. sorboza okazał się gorszym od laktozy induktorem biosyntezy celulaz. Niespecyficzna aktywność FPU filtratów otrzymanych po hodowlach *Trichoderma reesei* M-7 przy 1% mieszaninach obydwu cukrów w pożywce zasilającej (0,25% sorbozy i 0,75% laktozy oraz 0,5% sorbozy i 0,5% laktozy) utrzymywała się na podobnym poziomie jak w obecności 1% laktozy (tab. 3). Zwiększenie stężenia sorbozy do 0,75% i dalej do 1% powodowało ponad 3-krotne obniżenie aktywności FPU (0,35-0,38 FPU/cm³). Podobne tendencje stwierdzono w przypadku składników kompleksu celulolitycznego, przy czym β -1,4-endoglukanaza okazała się bardziej wrażliwa na obecność sorbozy do jej 0,5% stężenia, a aktywność aryl- β -glukozydazy ulegała większemu obniżeniu przy 0,75 i 1% koncentracji tego cukru w podłożu hodowlanym.

Zmiany aktywności ksylanaz filtratów pohodowlanych uzyskanych podczas hodowli ciągłej mutantu M-7 w obecności sorbozy były podobne do oznaczanych w filtratach pochodzących z hodowli w obecności galaktozy. Wzrost stężenia tego cukru w pożywce zasilającej był skorelowany ze stopniowym obniżeniem produkcji ksylanaz od $22,71 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$ (1% laktozy) do $6,51$ - $7,14 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$ w obecności 1% sorbozy.

Nie zaobserwowano natomiast wyraźnego wpływu stężenia sorbozy na aktywności enzymów autolitycznych, które utrzymywały się na prawie stałym poziomie bez względu na warunki hodowli ciągłej. Podobnie zmiany procentowego stosunku laktozy i sorbozy w pożywce zasilającej nie powodowały większych zmian w wydajnościach namnażania biomasy grzybni mutantu M-7.

4. Dyskusja

Wybór cukrów prostych: ksylozy, galaktozy i sorbozy, stosowanych oddzielnie i w połączeniu z laktozą jako źródło węgla podczas hodowli ciągłych *T. reesei* M-7 był nieprzypadkowy. Dobrze udokumentowany jest pozytywny wpływ jaki oligomery ksylozy: ksylobioza i ksylotrioza wywierają na produkcję enzymów ksylanolitycznych przez grzyby z rodzaju *Trichoderma*. Z kolei sorboza jest do tej pory jedynym

Tabela 2

Plon biomasy oraz stężenie białka i aktywność enzymatyczna filtratów pohodowlanych otrzymanych podczas hodowli ciągłej *Trichoderma reesei* M-7 w temperaturze 26°C przy różnych stężeniach laktozy i galaktozy

| Czas hodowli (doby) | Stosowanie stężeń laktoza/galaktoza (%) | Biomasa (mg/cm ³) | Białko (mg/cm ³) | Aktywność enzymatyczna filtratów pohodowlanych | | | | | | | | | |
|---------------------|---|-------------------------------|------------------------------|--|--|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--|---|--------------------------------------|--|--|
| | | | | FPU (μM/cm ³ × min) | β-1,4-endoglukanaza (U/cm ³) | β-glukozydaza (μM/cm ³ × min) | ksylanaza (μM/cm ³ × min) | chitynaza (nM/cm ³ × min) | β-1,3-glukanaza (μM/cm ³ × min) | proteaza (U/cm ³ × 10 ³) | β-galaktazydaza (U/cm ³) | | |
| 1 | | 4,07 | 1,72 | 1,07 | 27,32 | 0,171 | 19,75 | 19,55 | 2,24 | 6,45 | 0,0651 | | |
| 3 | 1/0 | 3,92 | 2,09 | 1,20 | 25,81 | 0,158 | 21,44 | 24,87 | 2,50 | 7,82 | 0,0695 | | |
| 4 | | 3,97 | 2,17 | 1,17 | 23,71 | 0,182 | 23,75 | 23,70 | 2,37 | 8,95 | 0,081 | | |
| 5 | | 4,12 | 2,19 | 1,14 | 23,75 | 0,165 | 24,82 | 26,74 | 2,25 | 9,8 | 0,076 | | |
| 6 | | 3,72 | 2,14 | 1,11 | 24,51 | 0,171 | 19,31 | 19,74 | 2,36 | 8,88 | 0,0501 | | |
| 7 | 0,75/0,25 | 3,98 | 2,01 | 1,05 | 25,18 | 0,157 | 17,42 | 20,85 | 2,38 | 7,85 | 0,043 | | |
| 8 | | 3,86 | 1,99 | 1,07 | 23,74 | 0,147 | 16,71 | 17,44 | 2,31 | 8,22 | 0,043 | | |
| 9 | | 3,91 | 1,91 | 1,04 | 22,18 | 0,149 | 16,95 | 19,53 | 2,25 | 8,37 | 0,039 | | |
| 10 | | 3,97 | 1,75 | 0,94 | 18,34 | 0,152 | 11,75 | 20,71 | 2,25 | 8,62 | 0,028 | | |
| 11 | 0,5/0,5 | 4,11 | 1,82 | 0,91 | 16,55 | 0,158 | 12,09 | 19,55 | 2,54 | 7,62 | 0,019 | | |
| 12 | | 3,87 | 1,79 | 0,88 | 17,81 | 0,139 | 9,64 | 22,33 | 2,92 | 7,60 | 0,020 | | |
| 13 | | 3,92 | 1,81 | 0,81 | 15,44 | 0,141 | 8,91 | 21,41 | 2,87 | 6,88 | 0,018 | | |
| 14 | | 4,07 | 1,57 | 0,76 | 16,84 | 0,12 | 8,14 | 17,58 | 2,70 | 6,21 | 0,011 | | |
| 15 | 0,25/0,75 | 4,25 | 1,42 | 0,68 | 13,52 | 0,091 | 8,05 | 16,44 | 2,91 | 5,96 | 0,0096 | | |
| 16 | | 4,47 | 1,42 | 0,53 | 12,81 | 0,071 | 9,75 | 17,81 | 3,69 | 5,86 | 0,0084 | | |
| 17 | | 4,71 | 1,39 | 0,51 | 11,78 | 0,065 | 8,51 | 15,55 | 3,45 | 5,40 | 0,006 | | |
| 18 | | 4,85 | 1,21 | 0,41 | 5,74 | 0,028 | 9,71 | 12,81 | 3,91 | 6,34 | 0,0024 | | |
| 19 | 0/1 | 5,07 | 1,12 | 0,36 | 4,35 | 0,017 | 8,74 | 11,71 | 4,20 | 6,74 | 0,0031 | | |
| 20 | | 4,48 | 0,81 | 0,21 | 3,01 | 0,011 | 7,45 | 8,65 | 4,56 | 6,64 | 0,0017 | | |
| 21 | | 4,38 | 0,79 | 0,23 | 0,83 | 0,011 | 8,12 | 10,71 | 4,41 | 6,91 | 0,0033 | | |

Tabela 3

Plon biomasy oraz stężenie białka i aktywność enzymatyczna filtratów podhodowlanych otrzymanych podczas hodowli ciągłej *Trichoderma reesei* M-7 w temperaturze 26°C przy różnych stężeniach laktozy i sorbozy

| Czas hodowli (doby) | Stosowanie stężeni laktoza/sorboza (%) | Biomasa mg/cm ³ | Białko (mg/cm ³) | Aktywność enzymatyczna filtratów podhodowlanych | | | | | | | |
|---------------------|--|----------------------------|------------------------------|---|--|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--|---|--------------------------------------|
| | | | | FPU (μM/cm ³ × min) | β-1,4-endoglukanaza (U/cm ³) | β-glukozydaza (μM/cm ³ × min) | ksylanaza (μM/cm ³ × min) | chitynaza (nM/cm ³ × min) | β-1,3-glukanaza (μM/cm ³ × min) | proteaza (U/cm ³ × 10 ³) | β-galaktozydaza (U/cm ³) |
| 1 | | 3,25 | 1,81 | 1,05 | 23,75 | 0,111 | 21,31 | 19,75 | 1,37 | 6,75 | 0,069 |
| 3 | 1/0 | 3,81 | 2,27 | 1,08 | 26,42 | 0,135 | 24,55 | 24,85 | 1,91 | 7,18 | 0,079 |
| 4 | | 4,17 | 2,31 | 1,17 | 28,54 | 0,138 | 23,71 | 25,63 | 2,12 | 9,41 | 0,074 |
| 5 | | 4,12 | 2,41 | 1,25 | 27,41 | 0,154 | 22,71 | 23,55 | 2,31 | 10,14 | 0,081 |
| 6 | | 4,07 | 2,11 | 1,24 | 24,51 | 0,167 | 20,71 | 26,18 | 2,54 | 11,14 | 0,083 |
| 7 | 0,75/0,25 | 3,97 | 2,07 | 1,19 | 23,56 | 0,156 | 19,26 | 25,75 | 2,38 | 11,59 | 0,071 |
| 8 | | 3,82 | 2,21 | 1,17 | 22,44 | 0,157 | 19,71 | 24,18 | 2,41 | 10,91 | 0,065 |
| 9 | | 3,92 | 1,97 | 1,21 | 22,52 | 0,160 | 18,95 | 25,51 | 2,35 | 11,74 | 0,073 |
| 10 | | 3,74 | 2,25 | 1,21 | 19,97 | 0,149 | 15,65 | 23,72 | 2,25 | 11,75 | 0,047 |
| 11 | 0,5/0,5 | 3,57 | 2,09 | 1,17 | 20,54 | 0,125 | 14,21 | 22,85 | 2,37 | 12,71 | 0,051 |
| 12 | | 3,68 | 2,17 | 1,19 | 21,16 | 0,131 | 14,95 | 24,36 | 2,45 | 11,04 | 0,037 |
| 13 | | 3,91 | 1,95 | 1,17 | 20,71 | 0,130 | 13,61 | 20,17 | 2,37 | 11,00 | 0,025 |
| 14 | | 3,42 | 1,71 | 0,85 | 18,71 | 0,11 | 11,67 | 24,31 | 2,72 | 10,70 | 0,017 |
| 15 | 0,25/0,75 | 3,33 | 1,45 | 0,71 | 19,42 | 0,092 | 12,87 | 23,37 | 2,64 | 11,24 | 0,0095 |
| 16 | | 3,42 | 1,38 | 0,64 | 16,55 | 0,075 | 9,54 | 21,65 | 2,31 | 10,91 | 0,0101 |
| 17 | | 3,21 | 1,19 | 0,59 | 14,82 | 0,074 | 9,87 | 24,34 | 2,65 | 9,55 | 0,00579 |
| 18 | | 3,71 | 1,07 | 0,42 | 10,71 | 0,052 | 7,14 | 21,34 | 3,02 | 10,34 | 0,0041 |
| 19 | 0/1 | 3,64 | 0,82 | 0,31 | 8,74 | 0,031 | 6,71 | 19,75 | 2,70 | 9,95 | 0,0038 |
| 20 | | 3,70 | 0,71 | 0,28 | 6,55 | 0,027 | 5,44 | 22,07 | 2,35 | 11,13 | 0,0034 |
| 21 | | 3,58 | 0,73 | 0,25 | 5,75 | 0,026 | 5,51 | 20,06 | 2,00 | 10,64 | 0,0043 |

poznanym cukrem prostym będącym induktorem celulaz *T. reesei*. Natomiast dodatek galaktozy do podłoża z laktozą podczas badań prowadzonych przez Morikawa i wsp. (36) powodował zwiększenie produkcji celulaz przez mutant *T. reesei*. Cukier ten okazał się ponadto najlepszym spośród testowanych w tej pracy induktorem biosyntezy β -galaktozydazy.

Dodatek do pożywki ksylozy i laktozy podczas hodowli ciągłej mutant *M-7* powodował zwiększenie produkcji ksylanaz, która osiągnęła maksimum, gdy obydwa cukry były zmieszane ze sobą w stosunku 1:1 (0,5 : 0,5%). Co ciekawsze, zaobserwowano nieznaczne, tylko w przybliżeniu 10-15%, obniżenie aktywności ksylanolitycznej przy 0,75 i 1% stężeniach cukru prostego w pożywce zasilającej. Mogło to być związane z ciągłym sposobem hodowli oraz szybkością zasilania pożywką przy której zmniejszał się represyjny wpływ ksylozy na produkcję enzymów ksylanolitycznych. Należy zaznaczyć, że produkcję niewielkich ilości ksylanaz w podłożu z ksylozą zaobserwowano także podczas hodowli okresowych *Trichoderma reesei* QM 9414 (37) i *Aspergillus terreus* (38). Podczas hodowli *Trichoderma longibrachiatum* następowało natomiast zahamowanie biosyntezy zarówno enzymów ksylanolitycznych jak i celulolitycznych (39).

Wiadomo, że laktoza jest efektywnym induktorem biosyntezy zarówno enzymów celulolitycznych jak i ksylanolitycznych. Produkcja obydwu grup enzymów jest zsynchronizowana u większości gatunków rodzaju *Trichoderma*. Nie budzi to zdziwienia biorąc pod uwagę fakt ścisłego naturalnego połączenia hemicelulozy i celulozy w biomacie roślinnej. Interesujące wyniki otrzymano w przeprowadzonych badaniach nad zależnościami pomiędzy procesami indukcji ksylanaz i celulaz u *Trichoderma longibrachiatum* (40). Laktoza indukowała produkcję jednych jak i drugich enzymów u tego grzyba, przy czym szybkość indukcji ksylanaz była niższa w porównaniu gdy jako źródła węgla były używane: ksylobioza i ksylotrioza. Różnice te, zdaniem autorów, są dowodem na odrębne mechanizmy indukcji przez te dwa substraty (laktozę i ksylozę). Zasugerowali oni również, że jedną z przyczyn wydłużenia okresu indukcji w obecności laktozy mógł być proces przekształcania tego cukru do tzw. prawdziwego induktora ksylanaz (*true inducer*). Zmieszanie obydwu cukrów w stosunku 1 : 1 spowodowało znaczne podwyższenie produkcji ksylanaz w porównaniu, gdy były one stosowane oddzielnie jako źródła węgla podczas hodowli *Trichoderma longibrachiatum*. Efekt ten jest podobny do mającego miejsce podczas hodowli ciągłej *Trichoderma reesei* *M-7* w temperaturze 26°C w obecności laktozy i ksylozy i w temperaturze 30°C w obecności laktozy i glukozy. Jego przyczyną podczas hodowli obydwu mikroorganizmów mogło być zwiększenie plonu biomasy lub wydłużenie okresu indukcji związane ze zmniejszeniem szybkości rozkładu induktora (laktozy) w obecności łatwo przyswajalnych cukrów w podłożu (ksylozy lub glukozy). Niewykluczone również, że mechanizm indukcji ksylanaz przez laktozę jest podobny do zaproponowanego przez Morikawa i wsp. (36) dla enzymów celulolitycznych i jest związany z aktywacją hipotetycznej permeazy katalizującej transport laktozy bądź jej pochodnych do wnętrza komórek. Indukcyjne działanie cukrów pro-

stych może być dwukierunkowe: przez zmniejszenie szybkości rozkładu induktora, spowodowane na przykład represją produkcji β -galaktozydazy oraz zwiększeniem szybkości jej pobierania. Być może etapem, który determinuje indukcję transkrypcji genów celulazowych bądź ksylanazowych jest dalszy metabolizm laktozy wewnątrz komórki. Sygnałem w tym procesie mogłyby być do pewnej wartości progowej stężenia dimery lub oligomery: celobioza, ksylobioza, ksylotrioza lub cukry proste: glukoza, ksyloza. Logiczna, jak się wydaje, jest możliwość zapoczątkowania tego procesu na etapie transportu laktozy do wnętrza komórek grzyba przez aktywację odpowiedniej permeazy lub kompleksu białek związanych z błoną komórkową. W dalszych badaniach mających na celu wyjaśnienie mechanizmu indukcji enzymów przez laktozę powinno właśnie koncentrować się na wyizolowaniu i określeniu głównych właściwości permeazy laktozy.

Wyniki pomiarów aktywności enzymatycznych celulaz i β -galaktozydazy podczas hodowli *T. reesei* M-7 w obecności laktozy i galaktozy były odwrotne od uzyskanych przez Morikawa i wsp. (36). Dodatek galaktozy do podłoża z laktozą powodował, o czym wspomniano już wcześniej, szybsze pobieranie tego drugiego cukru przez komórki grzyba oraz zmniejszenie produkcji celulaz podczas hodowli okresowej mutantu PC-3-7 *Trichoderma reesei*. Galaktoza okazała się także najlepszym spośród testowanych w pracy Morikawa i wsp. (36) cukrów, induktorem biosyntezy β -galaktozydazy przez badanego grzyba. Wyniki uzyskane w obydwu pracach są trudne do porównywania i formułowania na tej podstawie wniosków, gdyż dotyczą dwóch mutantów o być może całkowicie odmiennych metabolizmach. Duży wpływ na zróżnicowanie tendencji w zmianach aktywności enzymatycznych mógł mieć również ciągły lub okresowy sposób hodowli mikroorganizmów.

Indukcyjny wpływ sorbozy na produkcję celulaz *Trichoderma reesei* został stwierdzony przez Kawamori i wsp. (24). Badacze ci po wielostopniowej mutagenizacji *T. reesei* QM 9414 i procesie selekcji otrzymali mutanty odporne na represję kataboliczną wywołaną przez glukozę (seria KDG), a z nich z kolei produkujące celulazy w obecności sorbozy (seria P-C). Najlepszym spośród testowanych okazał się mutant o symbolu PC-3-7 opisywany już wcześniej w pracy. Ilości celulaz produkowanych przez mutanta podczas hodowli w podłożu z sorbozą były wyższe niż w przypadku celulozy AVICEL czy laktozy i zbliżone do uzyskiwanych w obecności najbardziej efektywnego induktora tych enzymów, tj. sorbozy. Sorboza i celuloza AVICEL mieszane ze sobą (0,3 : 1%) indukowały znacznie wyższą produkcję celulaz niż gdy były w tych samych stężeniach stosowane oddzielnie jako źródła węgla podczas hodowli mikroorganizmu. Co więcej, takie samo zjawisko miało miejsce po łącznym zastosowaniu glukozy i sorbozy zmieszanych w tych samych stosunkach podczas hodowli okresowej *T. reesei* PC-3-7.

Natomiast dodatek sorbozy do laktozy podczas przeprowadzonej w tej pracy hodowli ciągłej mutantu M-7 nie powodował zwiększenia produkcji celulaz. Sorboza okazała się również w tym przypadku gorszym od laktozy induktorem tych enzymów. Odmienne zachowanie mutantu *T. reesei* M-7 w porównaniu do PC-3-7 dowo-

dzi, że sorboza nie jest uniwersalnym induktorem celulaz *Trichoderma reesei*. Proces indukcji enzymów celulolitycznych przez ten substrat może zależeć od genealogii użytego mutantu, ukierunkowania procesu mutagenizacji i selekcji otrzymanych mutantów, a także stężenia i czasu dodania induktora do hodowli, rodzaju hodowli, obecności w podłożu innego źródła węgla i innych.

5. Wnioski

1. W przedstawionych w pracy wynikach badań potwierdzono możliwość użycia rozpuszczalnych cukrów jako induktorów biosyntezy celulaz i ksylanaz. Substraty te są łatwiejsze w porównaniu do celulozy do zastosowania, szczególnie podczas hodowli ciągłych *T. reesei*.

2. Sorboza okazała się gorszym od laktozy induktorem produkcji celulaz *T. reesei*. Jej 0,75% dodatek do 0,25% laktozy powodował zmniejszenie produkcji enzymów celulolitycznych podczas hodowli ciągłej mutantu M-7.

3. Wzrost stężenia ksylozy w podłożu indukował produkcję ksylanaz podczas hodowli ciągłej *T. reesei* M-7. Najwyższą aktywność tych enzymów w filtratach pochodzących oznaczono przy 0,5% stężeniach tego cukru w pożywce zasilającej i minimalnie tylko niższe przy 0,75 i 1%.

Praca została wykonana w ramach projektu badawczego nr 6 P04B 026 10 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

Literatura

1. Janas P., Kordowska-Wiater M., (1994), XXV Sesja Naukowa KTChŻ Lublin.
2. Shoemaker S., Schweickart V., Ladner M., Gelfand D., Kwok S., Myambo K., Ihnis M., (1983), *Bio/Technology*, 1, 691-696.
3. Chen C. M., Gritzali M., Stafford D. W., (1987), *Bio/Technology*, 5, 274-278.
4. Penttilä M., Lehtovaara P., Nevalainen H., Bhikhabhai R., Knowles J., (1986), *Gene*, 45, 253-269.
5. Saloheimo M., Lehtovaara P., Penttilä M., Teeri T. T., Ståhlberg J., Johansson G., Pettersson G., Claeysens M., Tomme P., Knowles J. K. C., (1988), *Gene*, 63, 380-386.
6. Mandels M., Reese E. T., (1960), *J. Bacteriol.*, 79, 816-826.
7. Mischak H., Hofer F., Messner R., Weissinger E., Hayn M., Tomme P., Esterbauer H., Kuchler E., Claeysens M., Kubicek C. P., (1989), *Biochim. Biophys. Acta*, 990, 1-6.
8. Hofer F., Weissinger E., Mischak H., Messner R., Meixner-Monori B., Blaas D., Visser J., Kubicek C. P., (1989), *Biochim. Biophys. Acta*, 992, 299-306.
9. Kubicek C. P., (1987), *J. Gen. Microbiol.*, 133, 1481-1487.
10. Kubicek C. P., Muhlbauer G., Grotz M., John E., Kubicek-Pranz E. M., (1988), *J. Gen. Microbiol.*, 134, 1215-1222.
11. El Gogary S., Leite A., Crivellaro O., Eveleigh D. E., El Dorny., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6138-6142.
12. Gritzali M., Brown R. D. Jr., (1979), *Hydrolysis of cellulose: Mechanism of enzymatic hydrolysis and acid catalysis*, Eds. Brown R. D., Jurasek L., 181, 237-603, American Chemical Society, Washington.

13. Kubicek-Pranz E. M., Vollenhofer S. K., Fritscher C., Plicka P., Hampel W. A., Kubicek C. P., (1991), *Enzyme. Microbiol. Technol.*, 13, 39-44.
14. Messner R., Kubicek-Pranz E. M., Gsur A., Kubicek C. P., (1991), *Arch. Microbiol.*, 155, 601-606.
15. Kubicek-Pranz E. M., Gruber F., Kubicek C. P., (1991), *J. Biotechnol.*, 20, 83-94.
16. Fritscher C., Messner R., Kubicek C. P., (1990), *Exp. Mycol.*, 14, 405-415.
17. Loewenberg J. R., Chapman C. M., (1977), *Arch. Microbiol.*, 113, 61-64.
18. Mandels M., Parnish F. W., Reese E. T., (1962), *J. Bacteriol.*, 83, 400-408.
19. Iyayi C. B., Bruchmann E.-E., Kubicek C. P., (1989), *Arch. Microbiol.*, 151, 326-330.
20. Vaheri M., (1982), *J. Appl. Biochem.*, 4, 356-363.
21. Sternberg D., Mandels G. R., (1979), *J. Bacteriol.*, 139, 761-769.
22. Sternberg D., Mandels G. R., (1980), *J. Bacteriol.*, 144, 1197-1199.
23. Esterbauer H., Steiner W., Labudova, Hermann A., Hayn M., (1991), *Biores. Technol.*, 36, 51-65.
24. Kawamori M., Morikawa Y., Takasawa S., (1985), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 235-236.
25. Janas P., Targoński Z., Udeh K. O., Waško A., (2001), *Pol. J. Food and Nutr. Sci.*, (wysłane do druku).
26. Mandels M., Weber J., (1969), *Adv. Chem. Ser.*, 95, 391-413.
27. Mandels M., Andreotti R., Roche C., (1976), *Biotechnol. Bieng. Symp.*, 6, 21-33.
28. Ghose T. K., (1987), *Pure and Appl. Chem.*, 59, 257-268.
29. Targoński Z., Szajer S., (1977), *Acta Microbiol.*, 269(3), 273-279.
30. Miller G. L., (1959), *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
31. Lovrien R. E., Gusek T., Hart B., (1985), *J. Appl. Biochem.*, 7, 258-272.
32. Lunt M. R., Kent P., (1960), *Biochim. Biophys. Acta*, 44, 371-373.
33. Targoński Z., (1991), *Biotechnologia*, 2, 50-58.
34. Colowick S. P., Kaplan N. O., (1955), *Meth. in Enzymol.*, 1, 214-247.
35. Lowry O. H., Rosenbourh N. J., Farr R. L., Rendel R. J., (1951), *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
36. Morikawa Y., Ohashi T., Mantani O., Okada H., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 106-111.
37. Hrmova M., Biely P., Vršanska M., (1986), *Arch. Microbiol.*, 144, 307-322.
38. Hrmova M., Biely P., Vršanska M., (1989), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 11, 610-616.
39. Royer J. C., Nakas J. P., (1989), *Enzyme. Microbiol. Technol.*, 11, 405-410.
40. Royer J. C., Nakas J. P., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 8, 2535-2539.