

AGNIESZKA MAJ, DANUTA WITKOWSKA

BADANIA NAD DEGRADACJĄ β -GLUKANÓW PRZY UDZIALE POZAKOMÓRKOWYCH HYDROLAZ GRZYBÓW *TRICHODERMA*

Streszczenie

Przedmiotem pracy było porównanie efektywności działania preparatów enzymatycznych grzybów *Trichoderma*, zawierających β -1,3-glukanazy i inne enzymy towarzyszące. Porównano proces hydrolizy β -glukanów różnego pochodzenia: laminarynu, β -glukanów drożdży piekarskich i drożdży *Yarrowia lipolytica* biomasy drożdży paszowych, grzybni *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Botrytis*. Proces był prowadzony w 50°C i pH 5,0 w zależności od ilości preparatu enzymatycznego i czasu działania. Najefektywniejszy w procesie degradacji β -glukanów drożdży *Y. lipolytica* i drożdży piekarskich okazał się preparat z *T. reesei* (RG). Natomiast w degradacji wszystkich rodzajów grzybni oraz laminarynu wyróżnił się preparat z *T. hamatum* (HMD).

Wstęp

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* wykazują zdolność wytwarzania licznych pozakomórkowych hydrolaz, w tym enzymów litycznych (β -1,3-glukanaz, chitynaz, celulaz i innych), odgrywających ważną rolę w hydrolizie substratów zawierających β -glukany. Enzymy te są wykorzystywane we współczesnej biotechnologii, ochronie roślin oraz w przemyśle spożywczym, paszowym, papierniczym i innych. Prezentowana praca jest fragmentem badań, mających na celu otrzymanie preparatów enzymatycznych z hodowli wybranych szczepów z rodzaju *Trichoderma* i zbadanie ich właściwości biotechnologicznych. Celem tej części badań było określenie i porównanie efektywności działania preparatów enzymatycznych zawierających β -1,3-glukanazy i inne enzymy towarzyszące w hydrolizie β -glukanów różnego pochodzenia. Ocena taka może być pomocna w ukierunkowaniu aplikacji preparatów enzymatycznych.

Materiały i metody badań

W badaniach wykorzystano preparaty enzymatyczne, otrzymane we wcześniejszych pracach (dane niepublikowane) z następujących hodowli na podłożu Saundersa:

preparat **HD** – *T. harzianum* T-33 (z dodatkiem 2% drożdży paszowych (DP) i 2% celulozy Avicel (AC)); preparat **RD** – *T. reesei* M 7-1 z dodatkiem 6% DP i 2% AC; preparat **HG** – *T. harzianum* T-33 z dodatkiem 6% grzybni odpadowej *Trichoderma* (GT); preparat **RG** – *T. reesei* M 7-1 z dodatkiem 6% GT i 2% AC; preparat **HMD** – *T. hamatum* C-1 z dodatkiem 2% DP i 2% AC. Preparaty enzymatyczne scharakteryzowano pod względem następujących aktywności enzymatycznych: **β -1,3-glukanaz** wobec laminarynu, (Sigma) [8]; **chitynaz** wobec chityny koloidalnej (Sigma) [14]; **FP-az** wobec bibuły filtracyjnej Whatam nr 1 [2]; **CMC-az** wobec NaCMC (Sigma) [2]; **ksylanaz** wobec ksylanu (Xylan from birchwood, Sigma) [1]; **β -1,6-glukanaz** wobec pustulanu (Sigma) [8]; **α -1,3-glukanaz** wobec lichenanu (Sigma) [8]; **α -1,6-glukanaz** wobec nigeranu (Sigma) [8]; **proteinaz** metodą Ansona wobec kazeiny (BDH) [6].

Hydroliza biopolimerów ścian komórkowych zawartych w biomasie grzybów i drożdży. Mieszaninę reagującą (3ml), którą stanowiło 0,15 g poszczególnych substratów (S) (preparowane β -glukany drożdży piekarskich i drożdży *Yarrowia lipolytica*, suszona biomasa drożdży paszowych, sucha grzybnia *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum* i *Botrytis cinerea*), (5% w/v) oraz roztwory preparatów enzymatycznych o aktywności β -1,3-glukanaz 1,68 U/ml (**HD-1**, **RD-1**, **HG-1**, **RG-1**, **HMD-1**) i 3,36 U/ml (**HD-2**, **RD-2**, **HG-2**, **RG-2**, **HMD-2**) w 0,05 M buforze octanowym o pH 4,8 wstrząsano na wstrząsarce laboratoryjnej w temperaturze 50°C przez 2, 4, 12 i 24 godziny i zagotowano (10 minut) we wrzącej łaźni wodnej celem przerwania reakcji. W hydrolizatach oznaczano: zawartość cukrów redukujących [3], glukozy (zestaw diagnostyczny BIOCHEMTEST (POCH, Gliwice) do enzymatycznego oznaczania glukozy) oraz N-acetyloglukozoaminy [4]. Wydajność procesu hydrolizy obliczono na podstawie ilości uwolnionych cukrów redukujących w stosunku do masy użytego substratu i wyrażono w procentach.

Hydroliza laminarynu. Mieszaninę inkubacyjną (1% roztwór laminarynu oraz roztwory preparatów enzymatycznych o aktywności 0,78 U/ml) inkubowano 30 i 120 minut w 50°C, zagotowano (10 minut) we wrzącej łaźni wodnej i po schłodzeniu oznaczono ilość glukozy (zestaw diagnostyczny BIOCHEMTEST - POCH, Gliwice). Wydajność procesu hydrolizy laminarynu obliczono na podstawie ilości uwolnionej glukozy w stosunku do masy użytego substratu i wyrażono w procentach.

Omówienie i dyskusja wyników

Stosowane w pracy preparaty enzymatyczne charakteryzowały się szerokim spektrum aktywności enzymatycznych. Wartości aktywności poszczególnych enzymów uzależnione były zarówno od gatunku grzyba, jak i od źródeł węgla i energii zastosowanych jako induktory w hodowli, z których otrzymano preparaty. Wielu auto-

rów podkreśla w swoich pracach indukcyjny charakter pozakomórkowych hydrolaz grzybów *Trichoderma* (β -1,3-glukanaz, chitynazy, celulazy) i stosowanie takich induktorów jak grzybnia, biomasa drożdży, ściany komórkowe grzybów i drożdży, celuloza itp. [5], [6], [7], [9], [11], [12], [13], [14], [15].

Najbardziej efektywnym spośród badanych okazał się preparat otrzymany z *T. hamatum* (HMD). Wyróżniał się on najwyższymi aktywnościami sześciu enzymów spośród dziesięciu oznaczonych, tj. β -1,3-glukanaz, FP-az, CMC-az, ksylanaz, lichenaz i proteinaz (Tab. 1).

Tabela 1

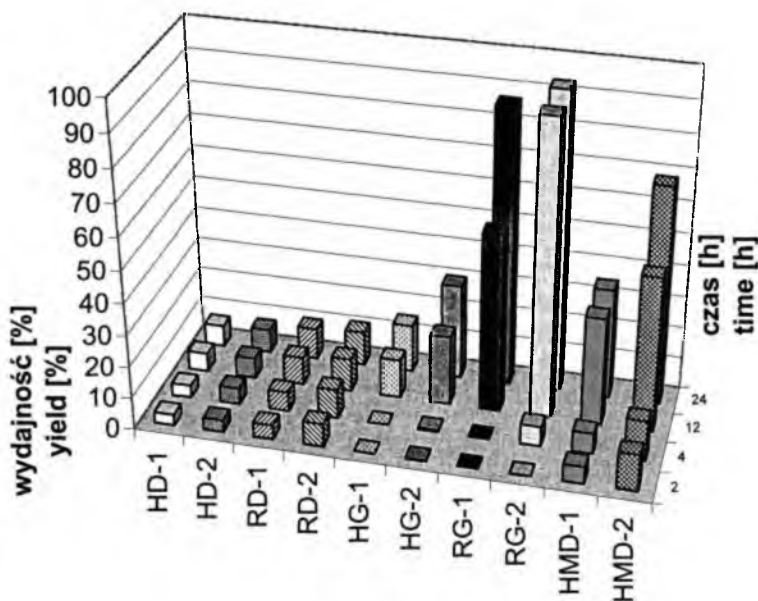
Charakterystyka preparatów enzymatycznych (Aktywność wyrażono w $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$ preparatu).
Characteristic of enzymatic preparations (enzymes activity in $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$ of preparation).

Aktywność enzymatyczna Enzyme activity	Rodzaj preparatu enzymatycznego Kind of enzyme preparation				
	HD	RD	HG	RG	HMD
β -1,3-glukanazy β -1,3-glucanases	427	457	221	108	1034
FP-azy FP-ases	36,1	42,8	34,3	43,3	129,0
CMC-azy CMC-ases	160,4	70,0	0,0	351,6	328,5
chitynazy chitinases	27,0	49,6	55,4	35,7	38,3
ksylanazy xylanases	150	200	100	6200	7080
mannanazy mannanases	35,9	44,9	35,9	26,9	18,0
pustulanazy pustulanases	1,2	0,65	0,0	18,0	9,0
α -1,3-1,4- glukanazy α -1,3-1,4- glucanases	996,8	736,4	116,7	170,6	619,6
lichenazy lichenases	740,8	893,5	857,6	687,0	1481,7
proteinazy * proteinases *	56,1	25,2	16,8	7,6	106

* Aktywność wyrażono w $\text{mmol}/\text{min} \cdot \text{g}$

* Activity in $\text{mmol}/\text{min} \cdot \text{g}$

Porównując aktywności enzymatyczne otrzymanych preparatów nasuwają się pewne prawidłowości. Preparaty otrzymane z hodowli z dodatkiem drożdży (łącznie z celulozą) wyróżniały się większą wartością aktywności β -1,3-glukanaz, α -1,3-1,4-glukanaz, a także proteinaz, w porównaniu do preparatów otrzymanych z hodowli z dodatkiem grzybni odpadowej. Natomiast preparaty otrzymane z hodowli, w której stosowano oprócz drożdży lub grzybni także dodatek celulozy, charakteryzowały się większą wartością aktywności celulaz (CMC-az, FP-az i ksylanaz), co świadczy o intensywniejszej indukcji tych enzymów. Dodatkowa obecność celulozy w podłożu (oprócz drożdży paszowych) wspomagała również indukcję α -1,3-1,4-glukanaz (Tab. 1).

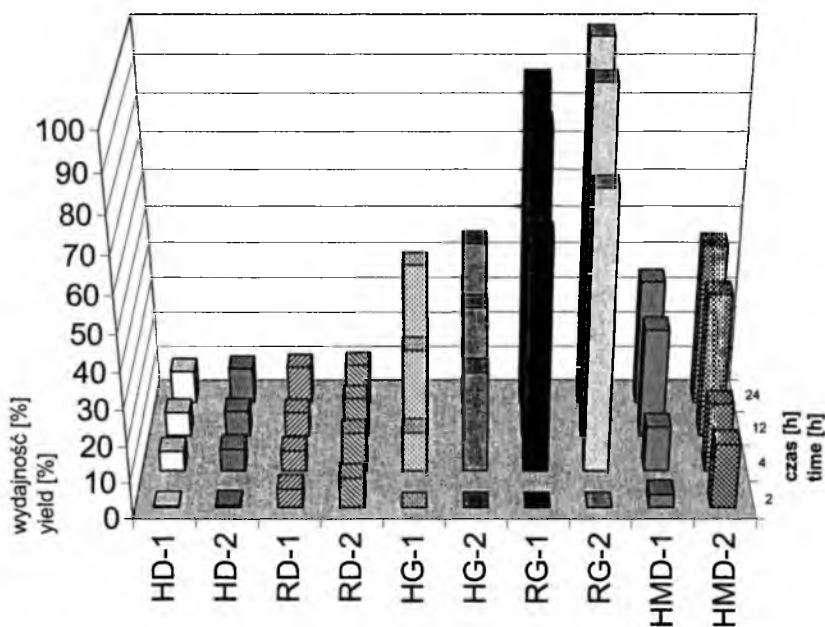


Rys. 1. Wydajność procesu hydrolizy preparowanych β -1,3-glukanów drożdży *Yarrowia* (w przeliczeniu na cukry redukujące).

Fig. 1. Yield of hydrolysis of prepared β -1,3-glucanases of *Yarrowia lipolytica* (in reducing sugars).

Badane preparaty enzymatyczne różniły się także efektywnością degradacji zarówno preparowanych β -1,3-glukanów (drożdży *Yarrowia lipolytica*, drożdży piekarskich) oraz suchej biomasy grzybni *Trichoderma*, *Fusarium*, *Botrytis*, a także drożdży paszowych. W przypadku hydrolizy β -glukanów: drożdży *Yarrowia* i drożdży piekarskich, efektywniejszym działaniem wyróżnił się preparat z *T. reesei* (RG) (otrzymany z hodowli na grzybni). Osiągnięto z jego udziałem około 60% wydajności procesu hydrolizy po 4 h, a wraz z wydłużaniem czasu do 12 h, uzyskano wydajność rzędu 80% (rys. 1, 2). Podobnie większa ilość glukozy (około 50 mg/150 mg S) była uwal-

niana z β -glukanów, niż z innych substratów pod wpływem preparatu z *T. reesei* (**RG**), uwalniając około 50 mg glukozy w warunkach metody (Rys. 4 B). W przeciwieństwie natomiast do preparowanych β -glukanów drożdży *Yarrowia* oraz drożdży piekarskich, biopolimery ścian komórkowych zawarte w suchej biomase drożdży paszowych były mniej podatne na hydrolizę pod działaniem preparatów enzymatycznych, powodując hydrolizę na poziomie od 7,5-11% (Rys. 3).

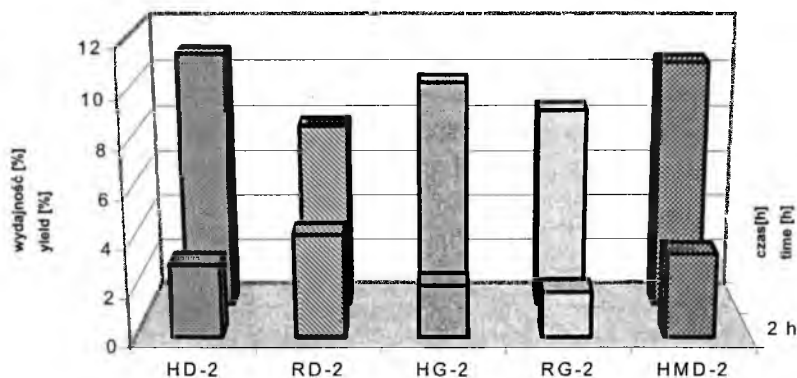


Rys. 2. Wydajność procesu hydrolizy preparowanych β -1,3-glukanów drożdży piekarskich (w przeliczeniu na cukry redukujące).

Fig. 2. Yield of hydrolysis of prepared β -1,3-glucanases of baker's yeast (in reducing sugars).

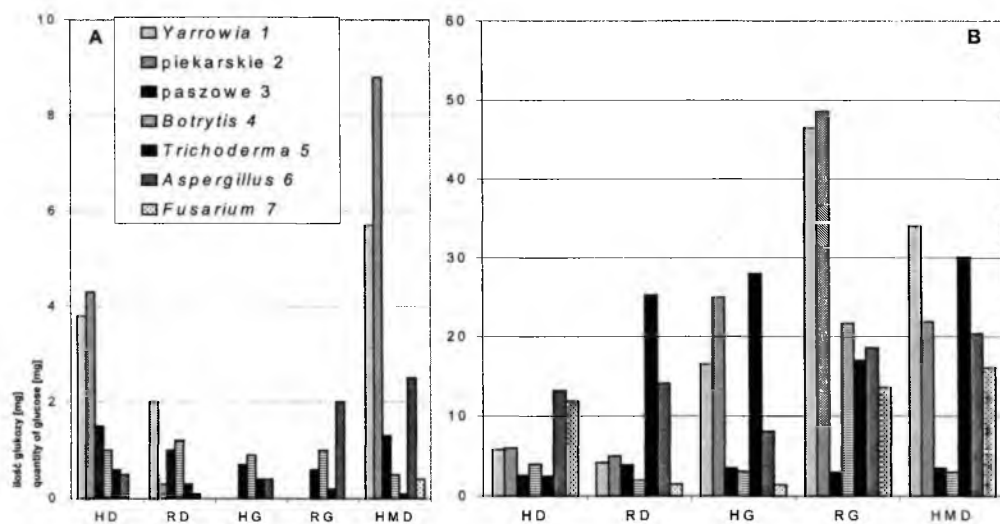
Ponieważ preparaty enzymatyczne były stosowane w ilości odpowiadającej tej samej wartości aktywności β -1,3-glukanaz, a preparat **RG** charakteryzował się najmniejszą aktywnością tego enzymu spośród badanych preparatów, wobec tego był stosowany w większej ilości niż pozostałe preparaty. Można więc sądzić, że udział enzymów towarzyszących także był większy, a szczególnie aktywność lichenaz (β -1,3-1,4-glukanaz) mogła znacznie wspomagać ten proces.

Enzymy zawarte w pozostałych preparatach, tj. z *T. hamatum* (**HMD**) i *T. harzianum* (**HG**), hydrolizowały β -glukany na poziomie około 40% wydajności (Rys. 1, 2). Proporcjonalnie uwolnione zostało mniej glukozy z biomasy drożdży w porównaniu z preparatami z *T. reesei* (Rys. 4).



Rys. 3. Wydajność procesu hydrolizy biomasy drożdży paszowych (w przeliczeniu na cukry redukujące).

Fig. 3. Yield of hydrolysis of fodder yeast biomass (in reducing sugars).

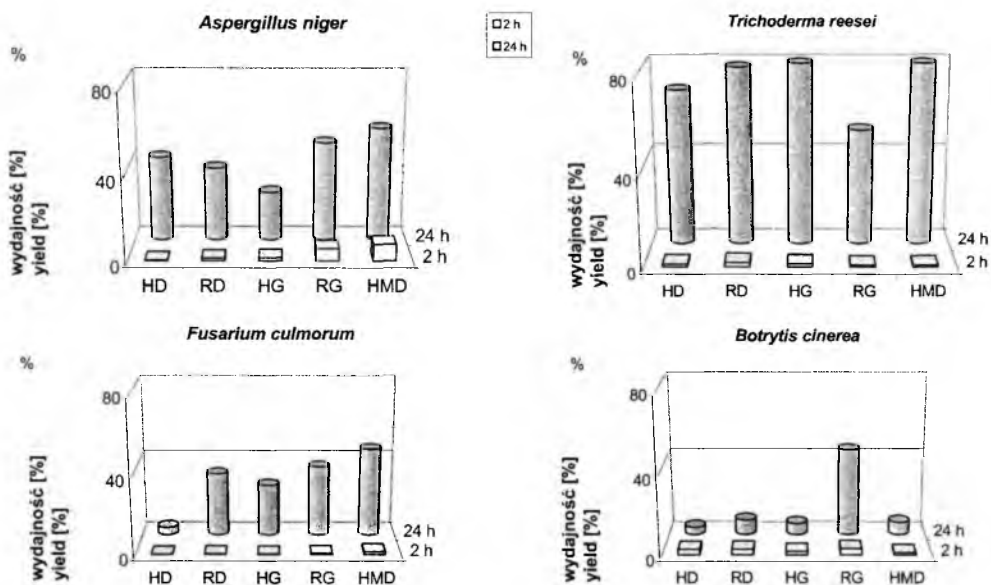


Rys. 4. Ilość uwolnionej glukozy [mg] po hydrolizie β -glukanów (1, 2) oraz biomasy (3, 4, 5, 6, 7) po 2 godzinach (A) i 24 godzinach (B).

Fig. 4. Quantity of glucose [mg] released from β -glucans after 2h (A) and after 24 h (B) of hydrolysis.

Proces degradacji biopolimerów ścian komórkowych zawartych w grzybni był także zależny od rodzaju preparatu enzymatycznego, czasu działania i rodzaju degradowanej grzybni (substratu). Efekt hydrolizy po 2 h był ledwie zauważalny, a nasilenie procesu nastąpiło wraz z wydłużeniem czasu. I tak po 24 h osiągnięto prawie 80%

degradacji grzybni *Trichoderma*, która była najskuteczniej degradowana przez większość preparatów (Rys. 5). W mniejszym stopniu były degradowane biopolimery ścian komórkowych grzybni *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum* i *Botrytis cinerea* (po 24 h około 30-50% wydajności procesu). Wprawdzie proces hydrolizy grzybni był obliczony na podstawie uwolnionych cukrów redukujących i większość enzymów towarzyszących brała udział w tym procesie, ale oznaczenie uwolnionej N-acetyloglukozoaminy (NAG) pozwoliło ocenić udział chitynaz w tym procesie. Największe ilości NAG (14-20 $\mu\text{mol}/150 \text{ mg S}$) były uwalniane po 24 h z grzybni *Trichoderma* pod wpływem enzymów badanych preparatów (z wyjątkiem **HD** z *T. harzianum* o najniższej aktywności chitynaz) (rys. 6A, 6B). W początkowym okresie hydrolizy, tj. po 2 h, ilość uwolnionej NAG była około 10-krotnie niższa w przypadku wszystkich preparatów (rys. 6).



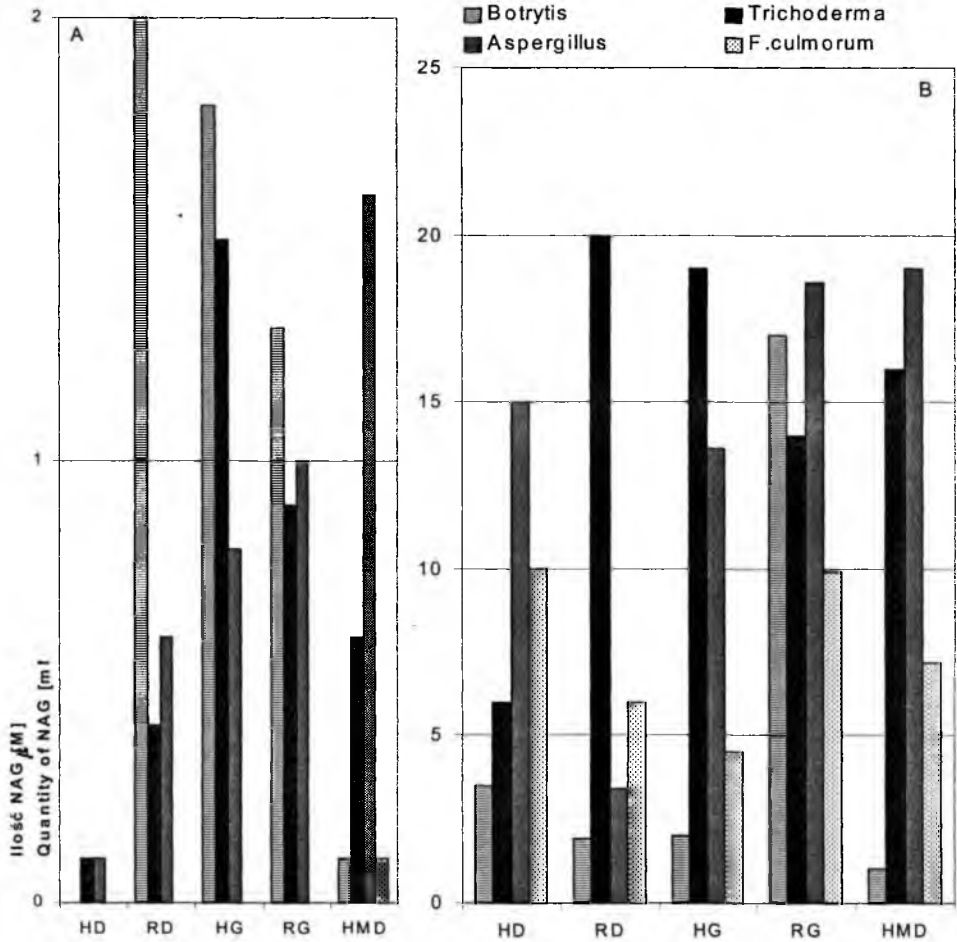
Rys. 5. Wydajność procesu hydrolizy grzybni (w przeliczeniu na cukry redukujące).

Fig. 5. Yield of hydrolysis of mycelium (in reducing sugars).

Z biopolimerów ścian komórkowych grzybni *Trichoderma reesei*, w porównaniu z grzybnią pozostałych organizmów, uwolniona także została największa ilość glukozy, która po 24 h osiągnęła wartość rzędu 18-30 mg/150 mg S i zwiększyła się ponad 40-krotnie w stosunku do pierwszego okresu hydrolizy, tj. 2 h (Rys. 4A, 4B).

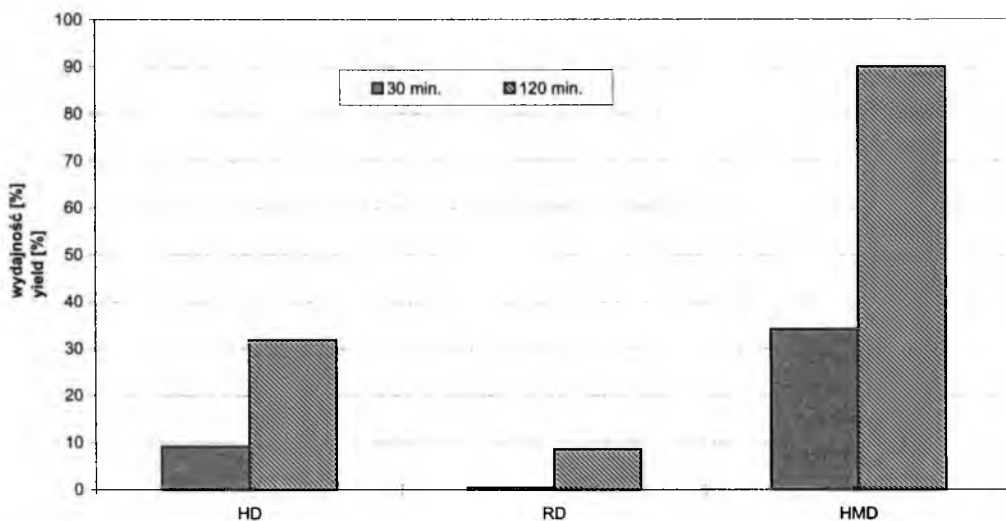
W pracy przeprowadzono także hydrolizę laminarynu, tj. polimeru glukozy połączonej wiązaniami β -1,3-glikozydowymi, z udziałem enzymów trzech preparatów (**HD**, **RD**, **HMD**). Preparat **HMD** charakteryzował się najwyższą aktywnością

β -1,3-glukanaz oraz lichenaz (Tab. 1) i był najefektywniejszy w degradacji laminarynu (po 24 h uzyskano 90% wydajności procesu). W przypadku pozostałych preparatów (HD i RD) wydajność procesu była na poziomie odpowiednio 3-krotnie i 9-krotnie niższym (Rys. 7).



Rys. 6. Ilość uwolnionej N-acetyloglukozoaminy (NAG) [μM] podczas hydrolizy 150 mg grzybni po 2 godzinach (A) i po 24 godzinach (B).

Fig. 6. Quantity of N-acetylglucosamine (NAG) [μM] released from mycelium after 2h (A) and after 24 h (B) of hydrolysis.



Rys. 7. Wydajność procesu hydrolizy laminarynu.

Fig. 7. Yield of hydrolysis of laminarin.

Wnioski

1. Badane preparaty enzymatyczne, pochodzące z hodowli wybranych szczepów z rodzaju *Trichoderma* charakteryzowały się, oprócz aktywności β -1,3-glukanaz, także aktywnościami innych hydrolaz α i β -glukanów.
2. Efektywność procesu hydrolizy badanych substratów, takich jak β -glukany drożdży piekarskich i *Y. lipolytica*, biomasa drożdży paszowych i grzybni *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum* i *Botrytis cinerea*, zależała od rodzaju preparatu enzymatycznego, jego ilości i czasu działania.
3. Najbardziej skuteczny w degradacji β -glukanów drożdży *Yarrowia* i drożdży piekarskich był preparat z *T. reesei* (RG), natomiast w degradacji wszystkich badanych rodzajów grzybni oraz laminarynu wyróżniał się preparat z *T. hamatum* (HMD).

LITERATURA

- [1] Bailey M.J., Biely P., Poutanen K.: International testing of methods for assay of xylanase activity, *J. Biotechnol.*, **23**, 1992, 257.
- [2] Mandels M., Andreotti R., Roche C.: Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **6**, 1979, 17.
- [3] Miller G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 1959, 426.

- [4] Peberdy J.F.: Polysaccharase activities in lytic enzyme preparations, Training Course of fungal protoplasts fusion and its applications, Dep. Microbiol. Attila Jozsef Univ. Szeged - Hungary, 6-17 July 1981.
- [5] Pisarevskaya I.V.: Lysis of a Fungus of the Genus *Pythium* by Complexes of Enzymes Produced by Mycophylic Fungi, *Prikl. Bioch. Mikrobiol.*, **33**, 6, 1997, 616.
- [6] Rodziewicz A.: Biosynthesis of hydrolytic enzymes of UV-mutants of *Bacillus subtilis* B-3 strain, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **6/47**, 2, 1997, 63.
- [7] Rudawska M., Kamoen O.: Regulation of β -1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*, *Arboretum Kórnickie*, R 37, 1992, 51.
- [8] Santos T., Villanueva J.R., Nombela C.: Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* glucanases. *J. Bacteriol.*, **129**, 1977, 52.
- [9] Schickler H., Haran S., Oppenheim A., Chet I.: Induction of the *Trichoderma harzianum* chitinolytic system is triggered by the chitin monomer, N-acetylglucosamine, *Mycol. Res.*, 1998, 102, 10, 1224
- [10] Sivan A.; Chet I.: Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*, *J.Gen. Microbiol.*, **135**, 1989, Pt.3, 675.
- [11] Targoński Z., Wójcik W.: Biosynthesis of extracellular enzymes by isolates, mutants and recombinant strains of *Trichoderma spp.* *Biotechnologia*, **1** (20), 1993, 14.
- [12] Thrane C., Tronsmo A., Jensen D.F.: Endo-1,3- β -glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum*: purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium spp.*, *Eur. J. Plant Pathol.*, **103**, 4, 1997, 331.
- [13] Torrie J.P., Senior D.J., Saddler J.N.: Production of β -mannanases by *Trichoderma harzianum* E58; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 1990, 303.
- [14] Ulhoa C.J., Peberdy J.F.: Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 1992, 236.
- [15] Witkowska D., Stempniewicz R., Maj A.: Lytic enzymes of *Trichoderma* and its utilization in yeast protoplast formation, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **8/49**, 2, 1999, 245.

STUDY ON DEGRADATION OF β -GLUCANS WITH *TRICHODERMA* EXTRACELLULAR HYDROLASES

Summary

The object of the studies was the comparison of the efficiency of *Trichoderma* enzymatic preparations in a β -glucan degradation. The hydrolytic process of substrates: yeast β -glucan (*Y. lipolytica*, baker's yeast), biomass of fodder yeast and mycelium (*Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Botrytis*) was conducted in pH 5,0; 50°C and in relation to quantity of enzymatic preparation and to time of process. The preparation from *T. reesei* (RG) was the most effective in degradation of β -glucan (*Y. lipolytica* and baker's yeast) and of fodder yeast biomass. The preparation from *T. hamatum* (HMD) was distinguished by degradation of examined mycelium biomass. ❖