

PIOTR JANAS, ZDZISŁAW TARGOŃSKI, TERESA RUDNICKA-PILAT

BIOSYNTETA BETA-GLUKANAZ PRZEZ MUTANTY *TRICHODERMA REESEI* PODCZAS HODOWLI OKRESOWYCH

Streszczenie

Cztery mutanty *T. reesei* były testowane pod kątem produkcji beta-glukanaz podczas hodowli okresowych w obecności różnych źródeł węgla. Nadproducent enzymów autolitycznych *Trichoderma viride* F-19 został użyty jako mutant porównawczy. Najwyższe aktywności beta-glukanaz oznaczono w filtratach otrzymanych po hodowlach *T. viride* F-19 i *T. reesei* VTT-D-78085 na pożywkach zawierających 1% mieszaniny glukanu i chityny w stosunku 1:1. Stwierdzono wysokie aktywności proteolityczne filtratów podczas hodowli mutantów w obecności 1% glukanu, które były związane z zanieczyszczeniem tego substratu substancjami białkowymi, działającymi indukcyjnie na produkcję tych enzymów. Beta - glukanazy produkowane przez *T. reesei* M-7 były odporne na glukozową represję kataboliczną.

Wstęp

Regulacja produkcji, mechanizm działania oraz oczyszczanie enzymów pochodzenia grzybowego zdolnych do rozkładania niecelulozowych beta-glukanów jest przedmiotem wielu prac badawczych od początku lat 60 XX w. Wynika to nie tylko z szerokich możliwości ich zastosowania w przemyśle, ale także z funkcji fizjologicznych jakie spełniają beta-glukanazy w cyklu życiowym grzybów. Wyniki badań opublikowanych w pierwszych pracach Reese i Mandels [14, 15] wskazywały na konstytutywny sposób produkcji tych enzymów u grzybów. Obecnie wiadomo że podlegają one regulacji przez indukcję i represję kataboliczną [13]. Zaobserwowano również możliwość zróżnicowania sposobów regulacji u gatunków grzybów należących do jednego rodzaju, a nawet u poszczególnych izoenzymów; na przykład 1,3-beta-glukanaza *Trichoderma longibrachiatum* podlega represji katabolicznej [20], a ten sam enzym produkowany przez *T. harzianum* i *T. viride* jest odpowiednio indukcyjny i konstytutywny [1, 2]. Naturalnym induktorem produkcji beta-glukanaz jest beta-

glukan oraz di- i trimeryczne produkty jego hydrolizy [18]. Mniej specyficzną i wolniejszą indukcję tego enzymu powodują również całe ściany komórkowe grzybów. Podczas hodowli, maksymalne wydzielanie beta-glukanaz do podłoża ma miejsce po wykorzystaniu źródła węgla i rozpoczęciu procesów autolitycznych [13]. W warunkach naturalnych zjawisko podwyższonej produkcji beta-glukanaz zaobserwowano podczas przejścia grzyba z fazy wzrostu do sporulacji [1]. Większość beta-glukanaz grzybów strzępkowych podlega represji katabolicznej, objawiającej się zahamowaniem ich produkcji w obecności łatwo przyswajalnego źródła węgla w podłożu [13]. Podobnie jak w przypadku celulaz, proces ten jest niezależny od poziomu cyklicznego AMP (cAMP) w komórkach *Trichoderma*. Badania prowadzone przy użyciu inhibitorów biosyntezy białka i RNA przez Santos i wsp. [16] udowodniły hamujący efekt glukozy na poziomie przedtranslacyjnym.

Duże zainteresowanie budzi morfogenetyczna funkcja beta-glukanaz grzybowych. Enzymy te wraz z chitynazami powodują zmiany struktury i składu ściany komórkowej podczas procesu wzrostu komórek, pączkowania i sporulacji. Ich działanie polega m.in. na tworzeniu w obrębie ściany wolnych przestrzeni dla nowo syntetyzowanych polimerów. Brak defektywnych mutantów w zakresie produkcji beta-glukanaz utrudnia niestety dokładne poznanie tych procesów [13].

Celem pracy było określenie i porównanie warunków biosyntezy beta-glukanaz przez wybrane mutanty *T. reesei*. Porównanie to dotyczyło hodowli prowadzonych w systemie okresowym na podłożach z dodatkiem różnych źródeł węgla. Mutantem referencyjnym zastosowanym w pracy był uznany producent enzymów autolitycznych *Trichoderma viride* F-19. Zbadano również aktywności proteaz w filtratach pochodzących mutantów.

Materiały i metody badań

Mikroorganizmy: Mutant *Trichoderma viride* F-19, o zwiększonych zdolnościach do produkcji enzymów litycznych, pochodził z Kolekcji Katedry Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa [21]. Mutant *Trichoderma reesei* M-7, otrzymany w wyniku mutagenizacji promieniowaniem UV *Trichoderma reesei* QM 9414 w Katedrze Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa, charakteryzował się zwiększoną produkcją enzymów celulolitycznych i ksylanolitycznych [6]. Mutanty *Trichoderma reesei* o symbolach: RUT C-30, VTT-D-78085, VTT-D-79125 pochodziły z VTT-Collection of Industrial Microorganism Technical Research Centre (Helsinki, Finlandia). Mutanty przechowywano na skosach brzezkowych w temperaturze 2°C, okresowo je przeszczepiając.

Oznaczanie aktywności enzymatycznych: W celu oznaczenia aktywności beta-1,3-glukanazy sporządzono 1% roztwór laminaryny w 0,1M buforze octanowym o pH = 4,8. Do odmierzonej objętości 0,9 cm³ roztworu laminaryny (Sigma) dodawano

0,1 cm³ odpowiednio rozcieńczonego filtratu pochodowlanego. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 50°C przez 30 min. Ilość uwolnionych cukrów redukujących oznaczano metodą kolorymetryczną przy użyciu odczynnika zawierającego kwas 3,5-dwunitrosalicylowy (DNS) po pomiarze absorpcji próby wobec kontroli odczynnikowej. Za jednostkę aktywności beta-1,3-glukanazy przyjęto taką ilość enzymu, która uwalnia 1 μmol glukozy w czasie 1 min w warunkach reakcji [21].

Oznaczenia aktywności proteolitycznej przeprowadzano wg metodyki opisanej przez Lovriena i wsp.[10]. Przygotowywano roztwór zawierający 100 mg azokazeiny (Sigma) w 10 cm³ 0,1M buforu octanowego o pH = 4,8 i dodawano kroplę 2-merkaptotetanolu. Do 0,9 cm³ tak przygotowanego roztworu dodawano 1,35 cm³ filtratu pochodowlanego i inkubowano w temperaturze 50°C przez 30 min. Po tym czasie reakcję przerywano dodając do objętości reakcyjnej 2,25 cm³ 5% kwasu trójchlorooctowego, a następnie wirowano przez 10 minut. Ekstynkcję cieczy nadosadowej odczytywano przy λ = 366 nm wobec kontroli odczynnikowej. Za jednostkę aktywności proteolitycznej przyjęto zmianę ekstynkcji mieszaniny reakcyjnej w ciągu minuty na 1 cm³ filtratu pochodowlanego.

Zawartość białka w filtratach pochodowlanych oznaczano metodą Lowryego i wsp. [9].

Zawartość cukrów redukujących oznaczano metodą z kwasem 3,5-dwunitrosalicylowym wg Miller [12].

Warunki hodowli: Hodowle okresowe mutantów prowadzono w kolbach Erlenmeyera o pojemności 500 cm³, wypełnionych 100 cm³ pożywki. Temperatura hodowli wynosiła 25°C, a pH=5,0. Skład podłoża hodowlanego wg Mandelsa i Webera [11] był następujący, w g/l: KH₂PO₄ (2,0), MgSO₄ (0,3), (NH₄)₂SO₄ (1,4), CaCl₂ (0,3), Tween 80 (1,0), ekstrakt drożdżowy (1,0), roztwór mikroelementów 0,5 cm³/dm³ zawierający: FeSO₄·7H₂O 5 g/dm³ MnSO₄·H₂O 1,96 g/dm³, ZnCl₂ 1,66 g/dm³, CoCl₂ 2 g/dm³. Stosowano następujące źródła węgla (10 g/l) : glukozę, galaktozę, otręby pszenne, otręby owsiane, ksylozę, ksylan z brzozy, celobiozę, karboksymetylocelulozę, glukan, chitynę oraz mieszaninę glukanu z chityną w stosunku 1:1 (5g/l : 5g/l).

Izolacja glukanu z mąki: Izolację glukanu z mąki żytniej przeprowadzono na podstawie schematu produkcji koncentratów rozpuszczalnych substancji balastowych [4]. 1000 g mąki żytniej umieszczano w 10 litrowym naczyniu i zalewano 9 l wody o temperaturze około 15°C. Obydwa składniki mieszano przez 15 minut i pozostawiano na 24 godz. w temperaturze pokojowej. Następnie zlewano ekstrakt z nad rafinatu i wirowano przy 3000 x g. W następnym etapie przeprowadzono koagulację termiczną białek glukanu w autoklawie przy nadciśnieniu 0,05 MPa, w czasie 30 minut. Po ochłodzeniu do temperatury 60°C, białka wytrącone podczas obróbki termicznej oddzielano przez wirowanie przy 6000 x g. Dla lepszego oczyszczenia stosowano również sączenie przez bibułę filtracyjną. Otrzymany przesącz był następnie zagęszczany

przy użyciu wyparki próżniowej, a uzyskany płynny koncentrat suszono do stałej masy w temperaturze 80°C i rozdrabniano. W tej postaci stosowano go jako źródło węgla podczas hodowli mutantów.

Oznaczanie zawartości białka w glukanie: W pierwszym etapie próby glukanu były spalane w gilzach szklanych z mieszaniną kwasu siarkowego i dodatków przyspieszających ten proces. W drugim etapie gilżę z mineralizatem umieszczano w autoanalizatorze Kjeltec 1030, w którym czynność rozcieńczenia i alkalizacji próby oraz destylacji amoniaku odbywała się w sposób automatyczny. Wynik zawartości białka przedstawiono w procentach suchej substancji.

Wyniki i dyskusja

Najwyższe aktywności enzymatyczne beta-glukanaz oznaczono w filtratach po hodowli trzech mutantów w obecności 1% glukanu otrzymanego z mąki żytniej jako jedyne źródła węgla (tab. 1, 2, 3). Najlepszym producentem tych enzymów okazał się mutant *T. reesei* o symbolu VTT-D-78085. Aktywność beta-glukanaz osiągnęła maksymalną wartość w czwartej dobie hodowli i wynosiła 1,3 $\mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$ (tab. 2). W przypadku tego mutantu oraz mutantu o symbolu RuT C-30 stwierdzono również najwyższe aktywności proteolityczne w tych warunkach hodowli (tab. 1). Wynikało to prawdopodobnie z zanieczyszczenia glukanu substancjami białkowymi, działającymi indukcyjnie na produkcję tych enzymów. Stężenie białka wynosiło 12,57% ogólnej masy glukanu. Wysokie aktywności beta-glukanaz oznaczono również w filtratach po hodowli mutantu M-7, nadproducenta enzymów celulolitycznych. W obecności 1% celobiozy wynosiły – 1,15 $\mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$, w obecności 1% ksylanu – 0,93 $\mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$, i były nieznacznie niższe (0,75 $\mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) w obecności glukozy jako represyjnego źródła węgla (tab. 4), co jest potwierdzeniem wyników wcześniejszych badań.

W celu uzyskania wyższych aktywności enzymatycznych beta-glukanaz, w następnym etapie pracy przeprowadzono hodowlę okresowe mutantów *Trichoderma reesei* w warunkach zbliżonych do występujących w naturze, a więc w obecności mieszaniny glukanu i chityny (0,5% : 0,5%), składników ścian komórkowych roślin, jako źródła węgla. Również w tych warunkach stwierdzono najwyższą aktywność tych enzymów w filtracie uzyskanym w czwartej dobie hodowli *T. reesei* VTT-D-78085 (tab. 5). Aktywność ta (2,25 $\mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) była około 2 do 20 razy wyższa od uzyskanych podczas hodowli tego mutantu w obecności pozostałych źródeł węgla. Była ona pozytywnie skorelowana z najwyższą szybkością utylizacji induktorów w podłożu. Produkcja beta-glukanaz przez pozostałe trzy mutanty była niższa w obecności mieszanych źródeł węgla, od maksymalnych obserwowanych podczas hodowli okresowych w obecności innych induktorów.

Tabela 1

Charakterystyka filtratów pochodzących otrzymanych po hodowlach okresowych mutantu *Trichoderma reesei* RUT C-30 w obecności różnych źródeł węgla.

Characteristics of culture filtrates obtained after batch cultivations of mutant *Trichoderma reesei* RUT C-30 in the presence of different carbon source.

| Źródło węgla (1%)/ Source of carbon (1%) | Czas hodowli (doby)/ Time of cultivation (days) | Aktywność beta-1,3-glukanazy ($\mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$)/ Activity of beta-1,3-glucanase ($\mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) | Aktywność proteolityczna ($\text{U}/\text{cm}^3 \times 10^3$)/ Proteolytic activity ($\text{U}/\text{cm}^3 \times 10^3$) | Zawartość białka ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)/ Protein content ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) | Pozostałość cukrów w podłożu ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)/ Residual sugar in medium ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) |
|---|--|---|---|--|---|
| Glukoza Glucose | 2 | 0,05 | 0,00 | 48,0 | 205,0 |
| | 4 | 0,17 | 3,70 | 88,0 | 142,5 |
| | 6 | 0,16 | 0,66 | 123,0 | 25,0 |
| Galaktoza Galactose | 2 | 0,08 | 0,00 | 52,5 | 145,0 |
| | 4 | 0,13 | 0,10 | 68,5 | 85,0 |
| | 5 | 0,08 | 0,69 | 79,0 | 22,5 |
| Otręby pszenne Bran | 6 | 0,03 | 0,00 | 92,5 | 17,5 |
| | 2 | 0,03 | 0,00 | 55,5 | 275,0 |
| | 4 | 0,06 | 1,06 | 78,5 | 147,5 |
| Otręby owsiane Oats roughage | 6 | 0,02 | 0,00 | 116 | 27,5 |
| | 2 | 0,10 | 0,00 | 51,5 | 237,5 |
| | 4 | 0,13 | 1,21 | 70,0 | 140,0 |
| Ksyloza Xylose | 6 | 0,05 | 0,07 | 83,5 | 25,0 |
| | 2 | 0,07 | 0,00 | 60,0 | 265,0 |
| | 4 | 0,17 | 0,00 | 88,0 | 217,5 |
| Ksylnan Xylan | 5 | 0,12 | 1,21 | 100,0 | 22,5 |
| | 6 | 0,06 | 0,57 | 86,0 | 15,0 |
| | 2 | 0,11 | 0,00 | 72,5 | 297,5 |
| Celobioza Cellobiose | 4 | 0,16 | 0,64 | 117,0 | 127,5 |
| | 5 | 0,09 | 1,06 | 136,0 | 47,5 |
| | 6 | 0,04 | 0,42 | 148,0 | 37,5 |
| Celuloza Cellulose | 2 | 0,08 | 0,30 | 67,0 | 490,0 |
| | 4 | 0,17 | 2,30 | 105,5 | 227,5 |
| | 5 | 0,20 | 0,44 | 120,0 | 25,0 |
| Glukan Glucan | 6 | 0,12 | 0,00 | 101,0 | 17,5 |
| | 2 | 0,04 | 0,00 | 65,0 | 417,5 |
| | 4 | 0,17 | 0,07 | 97,0 | 230,0 |
| Chityna Chitin | 6 | 0,03 | 1,73 | 122,0 | 40,0 |
| | 2 | 0,46 | 39,73 | 320,0 | 585,0 |
| | 4 | 0,30 | 31,92 | 528,5 | 247,5 |
| Chityna Chitin | 6 | 0,21 | 30,15 | 756,0 | 47,5 |
| | 2 | 0,01 | 0,00 | 375,0 | 25,0 |
| | 4 | 0,03 | 0,47 | 261,0 | 15,0 |
| 6 | 0,02 | 0,96 | 195,0 | 12,5 | |

Tabela 2

Charakterystyka filtratów pochodzących otrzymanych po hodowlach okresowych mutantu *Trichoderma reesei* VTT-D-78085 w obecności różnych źródeł węgla.

Characteristics of culture filtrates obtained after batch cultivations of mutant *Trichoderma reesei* VTT-D-78085 in the presence of different carbon source.

| Źródło węgla (1%) Source of carbon (1%) | Czas hodowli (doby) Time of cultivation (days) | Aktywność beta-1,3-glukanazy ($\mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) Activity of beta-1,3-glucanase ($\mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) | Aktywność proteolityczna ($\text{U}/\text{cm}^3 \times 10^3$) Proteolytic activity ($\text{U}/\text{cm}^3 \times 10^3$) | Zawartość białka ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) Protein content ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) | Pozostałość cukrów w podłożu ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) Residual sugar in medium ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) |
|--|---|--|--|---|--|
| glukoza glucose | 2 | 0,15 | 1,01 | 312,5 | 95,0 |
| | 4 | 0,33 | 3,90 | 284,0 | 35,0 |
| | 6 | 0,24 | 1,18 | 222,0 | 20,0 |
| galaktoza galactose | 2 | 0,08 | 1,46 | 294,0 | 77,5 |
| | 4 | 0,13 | 3,65 | 237,0 | 32,5 |
| | 5 | 0,17 | 4,20 | 174,0 | 22,5 |
| | 6 | 0,15 | 3,04 | 85,5 | 15,0 |
| otręby pszenne bran | 2 | 0,28 | 2,30 | 490,0 | 112,5 |
| | 4 | 0,63 | 5,13 | 397,5 | 62,5 |
| | 6 | 0,40 | 3,01 | 154,5 | 25,0 |
| otręby owsiane oats roughage | 2 | 0,27 | 1,90 | 595,0 | 85,0 |
| | 4 | 0,71 | 5,28 | 495,0 | 52,5 |
| | 6 | 0,49 | 2,69 | 276,0 | 32,5 |
| ksyloza xylose | 2 | 0,10 | 2,30 | 229,5 | 92,5 |
| | 4 | 0,29 | 4,96 | 105,5 | 35,0 |
| | 6 | 0,10 | 1,95 | 37,5 | 20,0 |
| ksylan xylan | 2 | 0,12 | 2,59 | 244,5 | 92,5 |
| | 4 | 0,20 | 6,54 | 160,0 | 35,0 |
| | 5 | 0,22 | 4,27 | 44,0 | 25,0 |
| celobioza cellobiose | 6 | 0,17 | 3,01 | 32,0 | 20,0 |
| | 2 | 0,04 | 4,10 | 10,0 | 92,5 |
| | 4 | 0,15 | 6,27 | 242,5 | 32,5 |
| celuloza cellulose | 5 | 0,19 | 11,88 | 435,5 | 20,0 |
| | 6 | 0,15 | 9,63 | 456,0 | 17,5 |
| | 2 | 0,04 | 1,23 | 318,0 | 72,5 |
| glukan glucan | 4 | 0,19 | 4,07 | 163,0 | 22,5 |
| | 6 | 0,15 | 2,02 | 41,5 | 15,0 |
| | 2 | 0,47 | 16,76 | 588,0 | 182,5 |
| chityna chitin | 4 | 1,30 | 27,06 | 623,0 | 107,5 |
| | 6 | 0,56 | 27,48 | 487,5 | 15,0 |
| | 2 | 0,01 | 1,51 | 480,0 | 20,0 |
| | 4 | 0,80 | 9,51 | 686,0 | 15,0 |
| | 6 | 0,46 | 10,37 | 882,0 | 15,0 |

Tabela 3

Charakterystyka filtratów pochodzących otrzymanych po hodowlach okresowych mutantu *Trichoderma reesei* VTT-D-79125 w obecności różnych źródeł węgla.

Characteristics of culture filtrates obtained after batch cultivations of mutant *Trichoderma reesei* VTT-D-79125 in the presence of different carbon source.

| Źródło węgla (1%)/ Source of carbon (1%) | Czas hodowli (doby)/ Time of cultivation (days) | Aktywność beta-1,3-glukanazy ($\mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$)/ Activity of beta-1,3-glucanase ($\mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) | Aktywność proteolityczna ($\text{U}/\text{cm}^3 \times 10^3$)/ Proteolytic activity ($\text{U}/\text{cm}^3 \times 10^3$) | Zawartość białka ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)/ Protein content ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) | Pozostałość cukrów w podłożu ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)/ Residual sugar in medium ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) |
|---|--|---|---|--|---|
| Glukoza Glucose | 2 | 0,27 | 1,88 | 315 | 190,0 |
| | 4 | 0,35 | 6,54 | 422,0 | 100,0 |
| | 6 | 0,32 | 6,40 | 234,0 | 17,5 |
| Galaktoza Galactose | 2 | 0,33 | 2,10 | 228,0 | 175,0 |
| | 4 | 0,39 | 5,70 | 311,5 | 95,0 |
| | 6 | 0,43 | 6,47 | 196,0 | 15,0 |
| Otręby pszenne Bran | 2 | 0,36 | 1,73 | 265,0 | 200,0 |
| | 4 | 0,37 | 4,42 | 399,5 | 127,5 |
| | 5 | 0,44 | 5,16 | 330,0 | 85,0 |
| | 6 | 0,41 | 4,74 | 258,0 | 45,0 |
| Otręby owsiane Oats roughage | 2 | 0,37 | 4,42 | 296,5 | 180,0 |
| | 4 | 0,45 | 5,43 | 423,5 | 110,0 |
| | 5 | 0,57 | 8,99 | 347,0 | 77,5 |
| | 6 | 0,50 | 8,10 | 288,0 | 42,5 |
| Ksyloza Xylose | 2 | 0,39 | 1,01 | 151,5 | 192,5 |
| | 4 | 0,42 | 4,94 | 263,5 | 105,0 |
| | 5 | 0,46 | 8,99 | 232,5 | 67,5 |
| | 6 | 0,50 | 8,10 | 176,0 | 27,5 |
| Ksylian Xylan | 2 | 0,36 | 3,06 | 184,0 | 185,0 |
| | 4 | 0,40 | 6,69 | 291,0 | 132,5 |
| | 5 | 0,41 | 7,60 | 368,5 | 105,0 |
| | 6 | 0,38 | 6,84 | 334,0 | 35,0 |
| Celobioza Cellobiose | 2 | 0,29 | 0,25 | 272,0 | 155,0 |
| | 4 | 0,31 | 3,95 | 353,0 | 90,0 |
| | 5 | 0,34 | 7,51 | 298,0 | 40,0 |
| | 6 | 0,31 | 6,88 | 246,0 | 15,0 |
| Celuloza Cellulose | 2 | 0,04 | 1,26 | 164,5 | 172,5 |
| | 4 | 0,21 | 5,01 | 286,0 | 90,0 |
| | 6 | 0,18 | 3,31 | 187,0 | 20,0 |
| Glukan Glucan | 2 | 0,14 | 22,72 | 432,0 | 197,5 |
| | 4 | 0,61 | 22,79 | 600,0 | 42,5 |
| | 6 | 0,18 | 18,88 | 388,5 | 20,0 |
| Chityna Chitin | 2 | 0,01 | 1,63 | 524,0 | 25,0 |
| | 4 | 0,07 | 16,62 | 664,0 | 15,0 |
| | 6 | 0,05 | 28,96 | 563,5 | 0,0 |

Tabela 4

Charakterystyka filtratów pochodzących otrzymanych po hodowlach okresowych mutantu *Trichoderma reesei* M-7 w obecności różnych źródeł węgla.

Characteristics of culture filtrates obtained after batch cultivations of mutant *Trichoderma reesei* M-7 in the presence of different carbon source.

| Źródło węgla (1%) Source of carbon (1%) | Czas hodowli (doby) Time of cultivation (days) | Aktywność beta-1,3-glukanazy ($\mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) Activity of beta-1,3-glucanase ($\mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) | Aktywność proteolityczna ($\text{U}/\text{cm}^3 \times 10^3$) Proteolytic activity ($\text{U}/\text{cm}^3 \times 10^3$) | Zawartość białka ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) Protein content ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) | Pozostałość cukrów w podłożu ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) Residual sugar in medium ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) |
|--|---|--|--|---|--|
| glukoza glucose | 2 | 0,26 | 2,79 | 212,5 | 265,0 |
| | 4 | 0,55 | 7,86 | 319,0 | 102,5 |
| | 5 | 0,75 | 10,86 | 372,0 | 45,0 |
| | 6 | 0,54 | 9,23 | 293,0 | 20,0 |
| galaktoza galactose | 2 | 0,23 | 0,10 | 253,0 | 255,0 |
| | 3 | 0,32 | 1,04 | 297,0 | 170,0 |
| | 4 | 0,16 | 4,77 | 336,0 | 85,0 |
| | 6 | 0,02 | 0,47 | 277,0 | 17,5 |
| otręby pszenne bran | 2 | 0,12 | 0,27 | 131,0 | 267,5 |
| | 4 | 0,22 | 5,53 | 224,0 | 92,5 |
| | 5 | 0,36 | 9,83 | 171,0 | 37,5 |
| | 6 | 0,34 | 7,58 | 137,0 | 15,0 |
| otręby owsiane oats roughage | 2 | 0,15 | 5,09 | 83,5 | 267,0 |
| | 4 | 0,27 | 17,01 | 156,0 | 90,0 |
| | 5 | 0,35 | 20,05 | 112,0 | 45,0 |
| | 6 | 0,28 | 18,30 | 94,0 | 20,0 |
| ksyloza xylose | 2 | 0,30 | 1,04 | 228,0 | 250,0 |
| | 4 | 0,15 | 3,28 | 321,0 | 87,5 |
| | 6 | 0,04 | 0,67 | 353,0 | 32,5 |
| ksylan xylan | 2 | 0,31 | 3,21 | 135,0 | 945,0 |
| | 4 | 0,59 | 4,27 | 277,5 | 50,0 |
| | 5 | 0,87 | 5,62 | 438,0 | 40,0 |
| | 6 | 0,93 | 5,14 | 486,0 | 32,5 |
| celobioza cellobiose | 2 | 0,30 | 0,22 | 286,0 | 102,5 |
| | 4 | 0,96 | 2,67 | 413,0 | 47,5 |
| | 5 | 1,15 | 4,32 | 472,5 | 30,0 |
| | 6 | 1,04 | 2,80 | 399,0 | 15,0 |
| celuloza cellulose | 2 | 0,22 | 0,00 | 110,5 | 417,5 |
| | 4 | 0,54 | 3,14 | 183,0 | 320,0 |
| | 6 | 0,70 | 9,70 | 241,5 | 265,0 |
| glukan glucan | 2 | 0,20 | 8,10 | 594,0 | 90,0 |
| | 3 | 0,30 | 9,77 | 700,0 | 45,0 |
| | 4 | 0,38 | 7,06 | 495,0 | 35,0 |
| | 6 | 0,02 | 0,52 | 291,0 | 15,0 |
| chityna chitin | 2 | 0,02 | 1,73 | 444,5 | 25,0 |
| | 4 | 0,09 | 18,12 | 665,0 | 15,0 |
| | 5 | 0,13 | 28,00 | 740,0 | 0,0 |
| | 6 | 0,13 | 23,95 | 736,0 | 0,0 |

Tabela 5

Charakterystyka filtratów pochodzących otrzymanych po hodowlach okresowych mutantów *Trichoderma reesei* w obecności mieszanego źródła węgla: 0,5% glukanu + 0,5% chityny.

Characteristics of culture filtrates obtained after batch cultivations of mutants of *Trichoderma reesei* in the presence of mixed carbon source: 0,5% glucan + 0,5% chitin.

| Mutant Mutant | Czas hodowli (doby) Time of cultivation (days) | Aktywność beta-1,3-glukanazy ($\mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) Activity of beta-1,3-glucanase ($\mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) | Aktywność proteolityczna ($\text{U}/\text{cm}^3 \times 10^3$) Proteolytic activity ($\text{U}/\text{cm}^3 \times 10^3$) | Zawartość białka ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) Protein content ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) | Pozostałość cukrów w podłożu ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) Residual sugar in medium ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) |
|------------------|---|--|--|---|---|
| RuT C-30 | 2 | 0,23 | 0,57 | 492,0 | 640,0 |
| | 3 | 0,22 | 1,14 | 510,0 | 550,0 |
| | 4 | 0,21 | 4,32 | 549,0 | 477,5 |
| | 5 | 0,14 | 3,51 | 558,0 | 65,0 |
| | 6 | 0,17 | 3,16 | 805,0 | 20,0 |
| VTT-D- 78085 | 2 | 1,03 | 5,58 | 579,0 | 82,5 |
| | 3 | 1,81 | 6,10 | 764,0 | 70,0 |
| | 4 | 2,25 | 7,93 | 728,0 | 57,5 |
| | 5 | 1,73 | 9,80 | 648,0 | 55,0 |
| | 6 | 1,39 | 7,75 | 630,0 | 40,0 |
| VTT-D- 79125 | 2 | 0,20 | 2,22 | 519,0 | 515,0 |
| | 3 | 0,21 | 3,83 | 594,0 | 507,5 |
| | 4 | 0,23 | 13,93 | 675,5 | 302,5 |
| | 5 | 0,35 | 18,10 | 816,0 | 67,5 |
| | 6 | 0,19 | 13,98 | 738,0 | 40,0 |
| M-7 | 2 | 0,22 | 8,69 | 564,0 | 440,0 |
| | 3 | 0,42 | 10,20 | 585,0 | 320,0 |
| | 4 | 0,47 | 10,47 | 592,0 | 75,5 |
| | 5 | 0,74 | 13,53 | 661,5 | 37,5 |
| | 6 | 0,79 | 12,42 | 780,0 | 20,0 |

W celu porównania przeprowadzono również hodowle okresowe uznanego producenta enzymów autolitycznych *Trichoderma viride* F-19, mutantu wyizolowanego w naszej Katedrze, w obecności 1% beta-glukanu i chityny stosowanych oddzielnie oraz obydwu polimerów zmieszanych w stosunku 1:1. Aktywności beta-glukanaz były maksymalne po czwartej dobie hodowli mutantu w obecności 0,5% glukanu i chityny i 2-krotnie wyższe ($4,51 \mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) od oznaczonych w filtratach *T. reesei* VTT-D-78085 (tab. 6). Były one pozytywnie skorelowane z bardzo wysokimi aktywnościami proteaz *T. viride* F-19, które były wyższe ($29,41-32,99 \text{ U}/\text{cm}^3$) od uzyskanych podczas hodowli wszystkich mutantów *Trichoderma reesei* w tych warunkach. Podobne tendencje w zakresie produkcji beta-glukanaz, jak w przypadku mutantów *T. reesei*, obserwowano w czasie hodowli *T. viride* F-19 w obecności 1% glukanu i chityny zasto-

sowanych oddzielnie jako źródło węgla. Były on aż ponad 35-krotnie wyższe na podłożu z glukaniem niż z chityną jako induktorem.

Tabela 6

Charakterystyka filtratów pochodzących otrzymanych po hodowlach okresowych mutantu *Trichoderma viride* F-19 w obecności chityny i glukanu.

Characteristics of culture filtrates obtained after batch cultivations of mutant *Trichoderma reesei* F-19 in the presence of chitin and glucan.

| Źródło węgla Source of carbon | Czas hodowli (doby) Time of cultivation (days) | Aktywność beta-1,3-glukanazy ($\mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) Activity of beta-1,3-glucanase ($\mu\text{M}/\text{cm}^3 \times \text{min}$) | Aktywność proteolityczna ($\text{U}/\text{cm}^3 \times 10^3$) Proteolytic activity ($\text{U}/\text{cm}^3 \times 10^3$) | Zawartość białka ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) Protein content ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) | Pozostałość cukrów w podłożu ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) Residual sugar in medium ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) |
|---|---|--|--|---|--|
| Chityna (1%)/ Chitin | 2 | 0,02 | 1,58 | 568,0 | 30,0 |
| | 3 | 0,04 | 6,30 | 585,0 | 20,0 |
| | 4 | 0,08 | 21,09 | 610,0 | 15,0 |
| | 5 | 0,10 | 30,64 | 710,0 | 0,0 |
| | 6 | 0,08 | 27,31 | 616,0 | 0,0 |
| Glukan (1%)/ Glucan | 2 | 3,51 | 0,00 | 333,0 | 172,5 |
| | 3 | 3,10 | 21,83 | 364,5 | 90,0 |
| | 4 | 1,77 | 22,37 | 255,5 | 37,5 |
| | 5 | 1,21 | 22,10 | 250,0 | 25,0 |
| | 6 | 0,75 | 22,07 | 215,0 | 17,5 |
| 0,5% chityna + 0,5% glukan/ 0,5% chitin+ 0,5% glucan | 2 | 0,21 | 2,15 | 539,0 | 455,0 |
| | 3 | 4,05 | 32,25 | 615,5 | 190,0 |
| | 4 | 4,50 | 32,99 | 654,5 | 90,0 |
| | 5 | 4,41 | 32,66 | 693,0 | 27,5 |
| | 6 | 4,26 | 29,41 | 905,0 | 17,5 |

Oprócz szerokich możliwości przemysłowych zastosowań beta-glukanaz i ich roli fizjologicznej, istnieje również negatywna strona ich działalności. Enzymy te, wykrywane w filtratach wielu szczepów i mutantów z rodzaju *Trichoderma*, wraz z proteazami i chitynazami oddziałują na ściany komórkowe i przez to mogą wpływać na przebieg hodowli mieszanych z udziałem innych grzybów lub drożdży. Przykładem może być łączna hodowla *T. reesei* C-30 i *Aspergillus phoenicis* w celu otrzymania pełnego kompleksu enzymów celulolitycznych bogatego w celobiazę. Obecność enzymów litycznych w surowych preparatach celulolitycznych wpływała na przebieg procesu łącznego scukrzania materiałów ligninocelulozowych i etanolowej fermentacji z wykorzystaniem drożdży [19].

Targoński [21] badał wpływ pH podłoża na produkcję beta-glukanaz, chitynaz i celulaz przez *T. reesei* QM 9414 i *T. viride* F-19 podczas hodowli okresowych w obecności celulozy MN-300, ksyłanu, chityny i grzybni *Aspergillus niger* jako źródła

węgla. Pomimo, że uzyskane aktywności beta-glukanaz były niższe niż w naszej pracy, badania te udowodniły, że *T. viride* F-19 jest cennym producentem enzymów odgrywających kluczową rolę w lizie ścian komórkowych grzybów.

Wyższe, zbliżone do oznaczanych przez nas w filtratach pochodowlanych mutantów *T. reesei* aktywności beta-glukanaz, uzyskali Theodore i Panda [22] podczas optymalizacji warunków hodowli (mieszanie, napowietrzanie, pH podłoża) *Trichoderma harzianum* do produkcji tych enzymów.

Wysokie aktywności beta-glukanaz, oznaczone po hodowli *T. reesei* M-7 w obecności represyjnego źródła węgla, są potwierdzeniem wyników wcześniejszych badań wpływu glukozy i laktozy na produkcję enzymów przez tego mutanta podczas hodowli ciągłych w różnych temperaturach [7]. Najwyższe aktywności beta-glukanaz obserwowano podczas hodowli ciągłej *T. reesei* M-7 w obecności 1% glukozy w temperaturze 34°C. Przyczyną tego zjawiska mogło być między innymi zwiększenie autolizy grzybni pod wpływem podwyższonej temperatury hodowli ciągłej. Uzyskane wyniki potwierdzają również doniesienia innych badaczy o odporności na represję kataboliczną beta-glukanaz niektórych grzybów strzępkowych jak np.: *Trichoderma harzianum*, *Claviceps fusiformis* czy *Penicillium oxalicum* [13]. Stwierdzono również, że niektóre grzybowe beta-glukanazy występują w kilku formach izoenzymatycznych, podlegających różnym mechanizmom regulacji biosyntezy, np. *Penicillium italicum* produkuje dwie beta-1,3-glukanazy o symbolach II i III, które są częściowo odporne na glukozową represję kataboliczną i jedną (beta-1,3-glukanaza I) bardzo wrażliwą na obecność glukozy w podłożu. Prawdopodobnie dwa pierwsze izoenzymy uczestniczą w procesach autolizy niezbędnych do ciągłej syntezy ściany komórkowej i wzrostu w obecności łatwo metabolizowanego źródła węgla oraz zmian konformacji ściany podczas braku glukozy w podłożu. Beta-1,3-glukanaza I jest z kolei produkowana w warunkach głodowych i jej funkcja polega pośrednio na dostarczeniu energii do komórek grzyba poprzez hydrolizę zewnątrzkomórkowych beta-glukanów [13].

Analogicznie jak w przypadku beta-1,3-glukanazy, zjawisko zwiększenia aktywności proteolitycznej w obecności glukozy w podłożu jest potwierdzeniem wyników wcześniejszych badań, w których glukoza była z powodzeniem stosowana jako źródło węgla w podłożu do produkcji tych enzymów przez *Trichoderma viride* F-19 [5]. Proteazy produkowane przez *Trichoderma reesei* są związane z celulazami, co powoduje trudności w otrzymaniu czystych preparatów tych enzymów [3]. Stąd też dobrą metodą otrzymywania proteaz wolnych od celulaz może być hodowla *Trichoderma reesei* w obecności glukozy hamującej produkcję tych ostatnich w wyniku represji katabolicznej. Podobne wyniki uzyskano podczas badań nad regulacją produkcji enzymów u *Trichoderma harzianum* [8]. Glicerol, w stężeniu jednoprocentowym, silnie hamował produkcję wszystkich enzymów kompleksu celulolitycznego mikroorganizmu, przy jednoczesnym podwyższeniu aktywności proteolitycznej w tych warunkach hodowli.

Zjawisko zwiększonej sekrecji proteaz w warunkach represyjnych jest charakterystyczne nie tylko dla rodzaju *Trichoderma*, lecz także innych grzybów strzępkowych. Smith i Wood [17] stwierdzili, podczas optymalizacji warunków hodowli do produkcji ksylanazy i beta-ksylozydazy, przy jednoczesnej maksymalnie niskiej produkcji proteaz, najwyższą aktywność tych ostatnich w obecności 1% glukozy jako źródła węgla.

Wnioski

1. Przeprowadzone badania potwierdziły, że *T. viride* F-19 jest cennym producentem enzymów odgrywających kluczową rolę w lizie ścian komórkowych grzybów i drożdży.
2. Najwyższe aktywności beta-glukanaz oznaczono po hodowlach *T. viride* F-19 i *T. reesei* VTT-D-78085 w warunkach zbliżonych do występujących w środowisku naturalnym, w obecności mieszaniny 0,5% glukanu i 0,5% chityny jako źródła węgla.
3. Wysokie aktywności proteolityczne obserwowane podczas hodowli mutantów w obecności 1% glukanu wynikały z zanieczyszczenia substancjami białkowymi, działającymi indukcyjnie na produkcję tych enzymów.
4. Odporność na glukozową represję kataboliczną beta-glukanaz produkowanych przez *T. reesei* M-7 jest potwierdzeniem wyników wcześniejszych badań.

LITERATURA

- [1] Del Ray I., Garcia-Acha I.: The regulation of beta-glucanase synthesis in fungi and yeast. *J. Gen. Microbiol.*, **110**, 1979, 83.
- [2] Dubourdiou D., Desplanques C., Villettaz J. Ribereau-Gayon P.: Investigations of an industrial β -D-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Carbohydr. Res.*, **144**, 1989, 277.
- [3] Dunne C.P.: Relationship between extracellular proteases and the cellulase complex of *Trichoderma reesei*. In: *Enzyme Engineering*. Eds.: J. Chibata, S. Fukui and L. B. Jr. Wingard, Plenum. Press, New York, 1982, s. 355.
- [4] Gebhart E., Poth B.: Veredelung von Roggen-Nutzung der löslichen Ballasts-toffe. *Die Mühle Mischfuttertechnik*, **133**, 1986, 423.
- [5] Janas P., Kordowska-Wiater M., Mleko S.: Izolacja protoplastów z *Trichoderma reesei* M-7 przy życiu enzymów litycznych z *Trichoderma viride* F-19. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, **4** (29), 2001, 15.
- [6] Janas P., Targoński Z.: Effect of temperature on the production of cellulases, xylanases and lytic enzymes by selected *Trichoderma reesei* mutants. *Acta Mycol.*, **30**, 1995, 255.
- [7] Janas P., Targoński Z., Udeh K.O., Waśko A.: Production of extracellular enzymes by *Tichoderma reesei* M-7 on mixtures of lactose and glucose at different temperatures. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* (wy-słane do druku).
- [8] Kalra M.K., Sidhu M.S., Sandhu D.K., Sandhu R.S.: Production and regulation of cellulases in *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 1984, 427.

- [9] Lowry O.H., Rosenbourh N.J., Farr R.L., Rendel R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 1951, 265.
- [10] Lovrien R.E., Gusek T., Hart B.: Cellulase and protease activities of commercially available cellulase preparations. *J. Appl. Biochem.*, **7**, 1985, 258.
- [11] Mandels W., Weber J.: The production of cellulase. In: *Cellulase and their application*. Adv. Chem. Ser. Eds.: G.J. Hajny, E.T. Reese, Pergamon Press, Oxford 1969, s. 391-413.
- [12] Miller G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, **31**, 1959, 426.
- [13] Pitson S.M., Seviour R.J., McDougall B.M.: Noncellulolytic fungal beta-glucanases: Their physiology and regulation. *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 1993, 178.
- [14] Reese E.T., Mandels M.: Beta-1,3-glucanases in fungi. *Can. J. Microbiol.*, **5**, 1959, 173.
- [15] Reese E.T., Mandels M.: *Advances in Enzymatic hydrolysis of cellulose and related materials* Ed.: E.T. Reese, Pergamon Press, Oxford, 1963, s. 197-234.
- [16] Santos T., Villanueva J.R., Nombela R.: Regulation of the β -1,3 glucanase system in *Penicillium italicum*: Glucose repression of the various enzymes. *J. Bacteriol.*, **133**, 1978, 542.
- [17] Smith D.C., Wood T.M.: Xylanase production by *Aspergillus awamori*. Development of a medium and optimization of the fermentation parameters for the production of extracellular xylanase and beta-xylosidase while maintaining low protease production. *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 1991, 883.
- [18] Stoppok W., Rapp P.: Formation, location, and regulation of endo-1,4-beta-glucanases and beta-glucosidases from *Cellulomonas uda*. *Appl. Envir. Microbiol.*, **44**, 1982, 44.
- [19] Szczodrak J., Targoński Z.: Selection of thermotolerant yeast strains for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 1988, 300.
- [20] Tangarone B., Royer J.C., Nakas J.P.: Purification and characterization of an endo-(1,3)-beta-D-glucanase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1989, 177.
- [21] Targoński Z.: Biosynteza celuloz, ksylanaz i enzymów litycznych przez *Trichoderma reesei* QM 9414 i *Trichoderma viridae* F-19. *Biotechnologia*, **2** (12), 1991, 50.
- [22] Theodore K., Panda T.: Self-directing optimization of beta-1,3-glucanase production by *Trichoderma harzianum* in batch culture. *Bioproc. Eng.*, **14**, 1996, 111.

BETA-GLUCANASES PRODUCTION BY *TRICHODERMA REESEI* MUTANTS DURING BATCH CULTIVATION IN THE PRESENCE OF DIFFERENT CARBON SOURCE

S u m m a r y

Four *Trichoderma reesei* mutants have been tested during batch cultivations for beta-glucanases production on the medium with different source of carbon. *Trichoderma viride* F-19 has been used as high-lytic enzyme-production reference strain. The highest activities of beta-glucanases have been estimated in culture filtrates obtained after cultivation of *T. reesei* VTT-D-78085 and *T. viride* F-19 on the medium with 1% mixture of chitin and glucan at the ratio 1:1. High proteolytic activities of culture filtrates obtained during cultivation in the presence of 1% of glucan were connected with high protein content in this substrate which acting as inducer of production of these enzymes. Beta-glucanases produced by *T. reesei* M-7 were resistant to glucose catabolite repression. ☒