

WOJCIECH CZUB, MARIANNA TURKIEWICZ

BIOSYNTeza SKLEROGLUKANU PRZEZ SZCZEP *SCLEROTIUM SP.*

Streszczenie

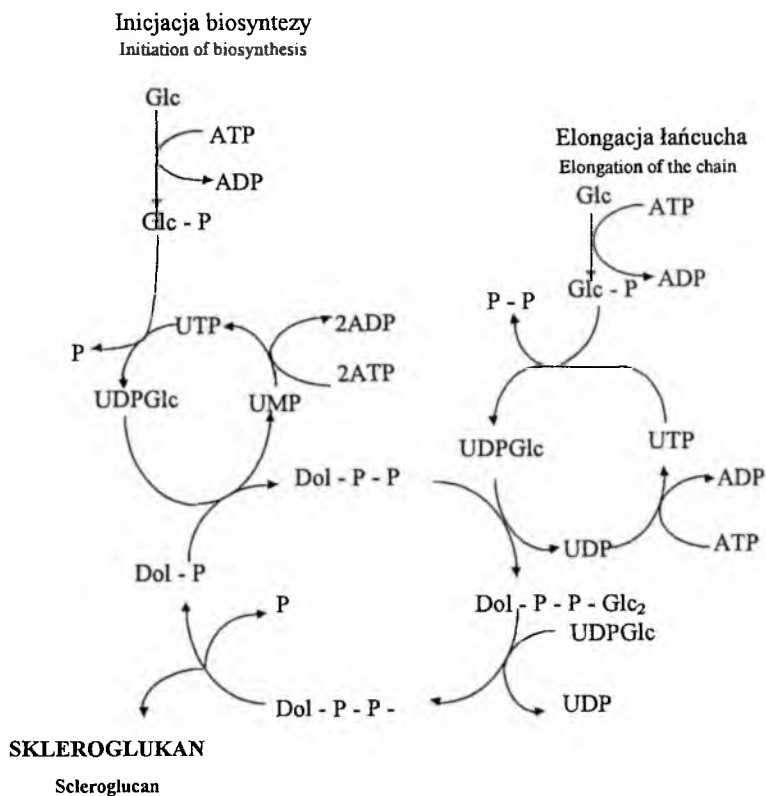
Wytwarzanie zewnątrzkomórkowych polisacharydów przez grzyby strzępkowe jest bardzo ściśle powiązane z warunkami hodowli: składem podłoża, napowietrzaniem, mieszaniem. Czynniki te wpływając na fizjologię mikroorganizmów, mogą znacznie zwiększać lub zmniejszać wydajność biosyntezy. W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano, że szczep *Sclerotium sp. IBT* produkuje skleroglukan z maksymalną wydajnością w podłożu z sacharozą (3%) jako źródło węgla, gdy materiałem szczepiennym jest 4-dniowa kultura grzyba z hodowli węglanej, dodawana do podłoża w ilości 4% (v/v). Wykazano, że istotny wpływ na biosyntezę polisacharydu ma też odpowiedni stopień natlenienia podłoża oraz stosunek molowy C/N w podłożu. W najlepszym wariantcie hodowli w ciągu 7 dni wzrostu grzyba z 1 litra podłoża uzyskuje się 8,6 g polisacharydu, przy produktywności 1,7 g/g grzybni i stopniu konwersji sacharozy do skleroglukanu wynoszącym 29%.

Wstęp

Skleroglukan, wytwarzany przez grzyby strzępkowe z rodzaju *Sclerotium*, jest pozakomórkowym β -(1 \rightarrow 3) glukanem, zawierającym liczne pojedyncze reszty glukopiranozy, połączone z liniowym szkieletem polisacharydu wiązaniami β -(1 \rightarrow 6)-glikozydowymi [1]. Cechują go interesujące właściwości: jest dobrze rozpuszczalny w wodzie i alkaliach, tworzy roztwory o dużej lepkości, które nawet przy niewielkim stężeniu polisacharydu są cieczami nienewtonowskimi. W pH z zakresu 2–12 trimero-we helikalne cząsteczki skleroglukanu zachowują swoją strukturę nawet w ciągu kilkuset dni w temperaturze 90°C, są więc zatem wyjątkowo termo- i pH-stabilne [2]. Te właściwości skleroglukanu czynią go bardzo atrakcyjnym produktem, który może znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym jako czynnik żelujący, stabilizujący oraz wiążący wodę i inne substancje [5]. Stwierdzono ponadto, że skleroglukan wykazuje właściwości antynowotworowe i już przy niewielkich dawkach pobudza i stymuluje układ immunologiczny zwierząt doświadczalnych [6]. Mechanizm biosyntezy tego

polimeru jest zbliżony do syntezy innych mikrobiologicznych β -glukanów (rysunek 1). Przyjmuje się, że główną drogą wytwarzania skleroglukanu jest bezpośrednia synteza z glukozy pochodzącej z podłoża hodowlanego. Zachodzi ona, gdy przy dostatecznej zawartości cukru w podłożu limitowany jest inny niezbędny do wzrostu składnik pokarmowy (azot, siarka, fosfor) [3, 4].

W artykule prezentujemy wyniki wstępnych badań nad biosyntezą skleroglukanu przez szczep *Sclerotium sp. IBT*, obejmujące m.in. doświadczenia nad doбором podłoża, wpływem stosunku C/N i ilości inokulum na produkcję polimeru w warunkach hodowli węgłnej.



Dol- wielonienasycony lipid, prawdopodobnie dolichol

Dol -multi-unsaturated lipid, probably dolichol

Rys. 1. Biosynteza skleroglukanu przez szczep *Sclerotium*.

Fig. 1. Biosynthesis of scleroglucan by the fungal strain *Sclerotium*.

Materiały i metody badań

Materiałem biologicznym był szczep *Sclerotium sp.* z kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej PŁ oraz *Sclerotium glaucanicum* USDA 3006, użyty w charakterze szczepu wzorcowego. W celu aktywacji grzyby przeszczepiano ze skosów agarowych do 100 ml kolb Erlenmayera zawierających 20 ml pożywki o składzie: glukoza – 30 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5 g/l; $(NH_4)_2SO_4$ – 1 g/l; KH_2PO_4 – 1 g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01 g/l; ekstrakt drożdżowy – 1 g/l. pH pożywki doprowadzano do 4,5 za pomocą 1M H_2SO_4 . Hodowle prowadzono na wstrząsarce (120 obr/min, amplituda 5 cm), w 28°C w czasie 5 dni. Wyrosłą kulturą (20 ml) szczepiono 180 ml pożywki umieszczonej w kolbie płaskodennej i inkubowano w identycznych warunkach przez 7 dni. Tak przygotowaną kulturą zaszczepiano odpowiednią ilość pożywki o składzie podobnym do wymienionego wcześniej, z wyjątkiem glukozy, którą w niektórych doświadczeniach zastępowano innymi sacharydowymi źródłami węgla. Hodowlę prowadzono w czasie do 16 dni w 500 ml kolbach płaskodennych. Biomasę po uprzednim odwirowaniu (10000 g, 15 min, 4°C) umieszczano na sączku GFC, przemywano wodą destylowaną, suszono (105°C, 24 godz.) i ważono. Skleroglukan wytrącano z cieczy pohodowlanej izopropanolem dodawanym w proporcji 2:1 (v/v). Wytrącony polimer odsączano przemywano alkoholem, suszono (80°C, 24 godz.) i ważono. Cukry ogólne oznaczano metodą Dubois z wykorzystaniem glukozy jako wzorca.

Wyniki i dyskusja

W badaniach wstępnych (tabela 1) wykazano, że najlepszym podłożem do biosyntezy skleroglukanu jest podłoże, które jako źródło węgla zawiera sacharozę w stężeniu 3%. Z jednego grama sacharozy powstaje wówczas 0,228 g skleroglukanu. Zwiększenie zawartości cukru w pożywce do 40 g/l powoduje 22% spadek ilości wyprodukowanego polisacharydu (z ok 6,8 do 5,3 g/l), a wydajność konwersji cukru w skleroglukan obniża się o ponad 40% (z 0,228 do 0,134 g/g sacharozy, tabela 1). Jest to zgodne z danymi literaturowymi. Oprócz sacharozy dobrym źródłem węgla do produkcji skleroglukanu okazał się być hydrol – odciek po trzeciej krystalizacji glukozy stanowiący odpad w produkcji tego cukru ze skrobi. Chociaż wydajność biosyntezy polimeru w odniesieniu do źródła węgla jest w podłożu z hydrolem o ok. 50% niższa niż w podłożu o analogicznym stężeniu sacharozy, a bezwzględna ilość skleroglukanu wytworzonego w 1 litrze podłoża jest o 2,15 g (63%) niższa, to jednak masa polisacharydu wytworzonego przez 1 gram grzybni *Sclerotium sp.* okazała się być najwyższa wśród wszystkich rodzajów podłoży i wynosiła aż ok. 1,4 g/g grzybni. Najmniej korzystnym sacharydowym źródłem węgla jest niewątpliwie fruktoza. W podłożu z tym cukrem badany szczep wytwarza zaledwie ok. 1,9 g skleroglukanu, a stopień konwersji fruktozy w polisacharyd wynosi jedynie ok. 6%, jest więc 3,5-krotnie niższy niż w najlepszym wariancie podłoża z sacharozą (Tabela 1).

Tabela 1

Wpływ źródła węgla na biosyntezę skleroglukanu (14 dniowa hodowla wglębna *Sclerotium sp.* – warunki i skład podłoża omówiono w materiałach i metodach).

Influence of carbon source on the scleroglucan biosynthesis (experiments were carried out, during 14 days, using parameters previously described in materials and methods).

Źródło węgla Carbon source g/l	Biomasa Biomass g/l	Skleroglukan Scleroglucan		Wydajność z 1g cukru Yield from 1g of carbon source g	Wydajność z 1g biomasy Yield from 1g of bio- mass g
		g/l	%		
glukoza 30 glucose	6,97	2,60	40,75	0,087	0,373
sacharoza 30 sucrose	6,46	<u>6,83</u>	100	<u>0,228</u>	1,057
sacharoza 40 sucrose	6,31	5,34	78,18	0,134	0,846
fruktoza 30 fructose	4,61	1,87	27,37	0,062	0,406
maltoza 30 maltose	4,79	3,58	52,41	0,119	0,748
hydrol 30	3,36	4,68	49,19	0,117	<u>1,393</u>

Tabela 2

Zależność wzrostu szczepu *Sclerotium sp.* od stopnia wypełnienia kolb podłożem (standardowe warunki hodowli, źródło węgla - sacharoza).

Dependence of the *Sclerotium sp.* strain growth on the volume of the growth medium (standard parametrs of incubation, carbon source - sucrose).

Ilość podłoża w 500 ml kolbie Volume of growth medium in 500 ml flask	dzień hodowli day of a culture		2	4	7	9	11	13	16
	50 ml (10%)	skleroglukan scleroglucan		0,34	0,40	0,63	0,39	<u>1,09</u>	1,11
biomasa biomass			0,35	2,13	4,55	5,58	<u>6,15</u>	5,70	5,40
100 ml (20%)	skleroglukan scleroglucan		0,22	0,76	0,85	<u>1,27</u>	0,60	0,73	0,41
	biomasa biomass		2,20	3,63	6,00	9,09	<u>9,75</u>	9,5	9,29
200 ml (40%)	skleroglukan scleroglucan		0,90	2,53	<u>6,84</u>	3,37	3,03	2,91	3,20
	biomasa biomass		3,06	5,40	6,46	6,98	<u>7,37</u>	7,06	6,94

Tabela 3

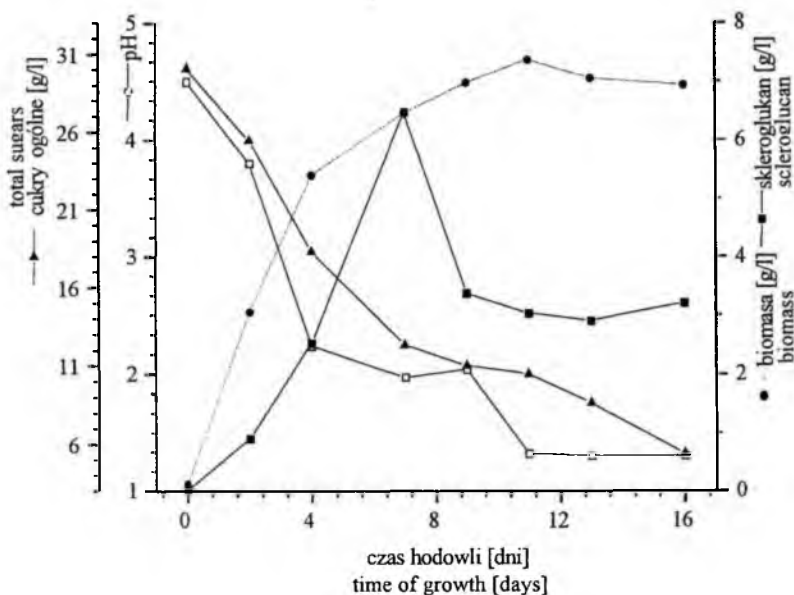
Wpływ inokulum na wzrost *Sclerotium sp.* i biosyntezę skleroglukanu. Hodowlę prowadzono w warunkach standardowych opisanych w materiałach i metodach z wykorzystaniem sacharozy jako źródła węgla. Influence of inoculum on growth of the *Sclerotium sp.* and scleroglucan biosynthesis (incubation was carried out using standard parameters described in materials and methods and sucrose as carbon source).

Czas inkubacji inokulum Time of incubation of inoculum	Ilość inokulum Volume of inoculum [% v/v]	Biomasa Biomass [g/l]	Skleroglukan Scleroglucan	
			[g/l]	%
4 dni days	2	4,675	6,4	74
	4	5,095	<u>8,6</u>	100
	6	4,545	5,6	65
	8	5,075	6,8	79
	10	4,575	3,0	35
7 dni days	2	5,565	1,2	14
	4	4,945	<u>5,4</u>	63
	6	4,78	3,4	40
	8	4,465	3,8	44
	10	4,525	0,6	7
10 dni days	2	4,61	1,2	14
	4	4,41	<u>4,8</u>	56
	6	3,67	4,5	52
	8	4,14	3,8	44
	10	4,5	2,1	24
14 dni days	2	4,45	1	11
	4	4,315	3,7	43
	6	4,375	<u>4,1</u>	48
	8	4,19	3,5	41
	10	4,245	2,9	34

W kolejnej serii doświadczeń został określony wpływ napowietrzania kultury grzyba na wydajność biosyntezy skleroglukanu. Zmieniając stopień wypełnienia naczyń hodowlanych podłożem od 10 do 40% stwierdzono, że we wszystkich wariantach hodowli największe nagromadzenie biomasy zostaje osiągnięte w 11 dobie, natomiast wzrost wypełnienia kolby podłożem, którego wynikiem jest spadek stopnia natleniania pożywki, powoduje skrócenie czasu maksymalnego nagromadzenia skleroglukanu z 11-16 dób, przy 10%-owym wypełnieniu kolb, do 9 dób przy 20%-owym i 7 przy 40%-owym. Podczas gdy poziom biomasy grzyba zmienia się po osiągnięciu maksimum tylko w niewielkim stopniu we wszystkich wariantach hodowli, ilość skleroglukanu utrzymuje się po osiągnięciu maksimum tylko w podłożu najlepiej napowietrzonym (10%). W dwu pozostałych wariantach szybko spada. Biorąc jednak pod uwagę ilość wyprodukowanego z 1 l podłoża polimeru (6,84 g), 5-6-krotnie wyższą niż w

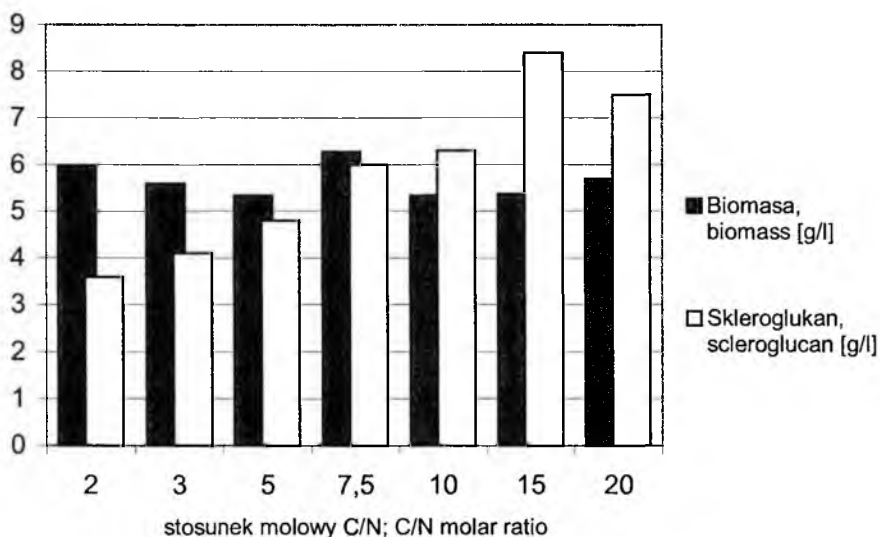
pozostałych wariantach, a także stopień konwersji sacharozy w produkt (23%) i korzystną jego proporcję względem wytworzonej biomasy (1,06g/g grzybni), wariant hodowli najslabiej napowietrzanej (40% wypełnienie kolby podłożem) okazał się najlepszy. Dalsze obniżanie stopnia natlenienia hodowli powodowało już spadek wydajności procesu biosyntezy skleroglukanu (wyniki nie zamieszczone). Przedstawione rezultaty dowodzą zatem, że dostarczenie zbyt dużej ilości tlenu powoduje zwiększenie tempa wzrostu grzyba i zmniejszenie produkcji zewnątrzkomórkowego glukanu. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez Rau'a i wsp. [7] w hodowlach fermentorowych *Sclerotium glucanicum* przy różnych szybkościach mieszania. Chociaż synteza glukanów jest reakcją wymagającą energii, co powiązane jest bezpośrednio z wykorzystaniem tlenu, stymulację ich syntezy na drodze limitacji O_2 należy też rozpatrywać pamiętając, iż wiele systemów enzymatycznych jest indukowanych lub podlega represji przez tlen [4]. Jest też możliwe, że w trakcie hodowli przy różnych wypełnieniach kolb (10, 20, 40%) różnice w prężności tlenu mogą w sposób pośredni wpływać na wydajność syntezy poprzez wpływ na morfologię szczepu i w związku z tym na zmianę reologii środowiska (przy 10% wypełnieniu wzrost szczepu następuje w postaci pojedynczych kuleczek, natomiast przy wypełnieniu kolb hodowlanych podłożem w ilości 40% grzybnia rośnie jako duża pulpa). Innym czynnikiem rzutującym na wydajność syntezy skleroglukanu jest tworzenie przez grzyby rodzaju *Sclerotium* kwasu szczawowego, którego biosynteza konkuruje z biosyntezą skleroglukanu o substrat węglowy. W omawianej serii doświadczeń stwierdzono ponadto, że w przypadku dużej prężności tlenu w środowisku (wariant 1 hodowli, Tabela 2) następuje zwiększenie ilości produkowanego szczawianu z równoczesnym ograniczeniem tempa syntezy polisacharydu.

Rysunek 2 przedstawia dynamikę wzrostu *Sclerotium sp.* na podłożu z sacharozą przy 40%-owym wypełnieniu kolb pożywką. Biosynteza skleroglukanu jest ściśle powiązana ze wzrostem komórek i osiąga największą wydajność pod koniec fazy logarytmicznej. W trakcie tego procesu następuje duży spadek wartości pH (do 1,3). Po siódmej dobie hodowli obserwuje się znaczny spadek ilości skleroglukanu, chociaż stężenie źródła węgla w podłożu jest nadal znaczne. Na wydajność biosyntezy polimeru duży wpływ ma wielkość i wiek inoculum (tabela 3). Największe nagromadzenie wielocukru (8,6 g/l) ma miejsce, gdy hodowlę szczepi się 4% (v/v) 4-dniowego inoculum. Wydłużenie czasu hodowli inokularnej prowadzi do spadku ilości syntetyzowanego polimeru, przy czym im starszy materiał używa się do szczepienia tym maksymalna ilość wytwarzanego skleroglukanu jest coraz to mniejsza (63% dla 7-dniowego, 56% dla 10 i 48% dla 14-dniowego inoculum). Pewne rozbieżności pomiędzy danymi dla inoculum o różnym wieku wynikają najprawdopodobniej z wykorzystywania źródła węgla do wytwarzania produktów ubocznych.



Rys. 2. Dynamika wzrostu szczepu *Sclerotium sp. IBT* na podłożu z sacharozą (3%) przy 40% wypełnieniu kolb pożywką.

Fig. 2. Dynamics of the *Sclerotium sp. IBT* strain growth on medium containing 3% of sucrose at 40% flask fulfilment.



Rys. 3. Wpływ stosunku molowego C/N na biosyntezę skleroglukanu (podłożo z 3% sacharozą, ilość źródła azotu w zależności od stosunku C/N).

Fig. 3. An influence of C/N molar ratio on sclerotoglucan production (medium with 3% of sucrose, amount of nitrogen depend on C/N ratio).

Wyniki dalszych badań wskazują, że ilość syntetyzowanego polimeru w dużej mierze zależy od stosunku molowego źródła węgla i azotu w podłożu (Rysunek 3). Optymalny dla biosyntezy skleroglukanu przez badany szczep stosunek molowy C/N wynosi 15. Jego zmniejszenie do 2 prowadzi do spadku ilości polimeru o ok. 56% przy nieznacznym wzroście masy grzybni. Spadek wydajności syntezy polimeru (do 89% maksymalnej ilości) widoczny jest także przy zwiększeniu stosunku molowego C/N powyżej optymalnej wartości. Należy dodać, że o ile maksymalna wydajność biosyntezy skleroglukanu przez *Sclerotium sp. IBT* w najlepszym opracowanym wariantcie hodowli (podłoże z 3% sacharozy szczepione 4% 4-dniowego inokulum, hodowla węgłbna szczepu w 28°C w ciągu 7 dni przy 120 obr/min, amplitudzie 5 cm i 40% wypełnieniu kolb podłożem) osiągnięta w niniejszej pracy wynosi 8,6 g/l, to w tych samych warunkach odnośnikowy szczep *Sclerotium glucanicum* USDA 3006, uważany za szczep o walorach przemysłowych produkuje polisacharyd w ilości 10,6 g/l w 11 dniowej hodowli. Można przypuszczać, że dalsza optymalizacja procesu biosyntezy skleroglukanu przez szczep z naszej kolekcji pozwoli zmniejszyć tę różnicę.

Wnioski

1. Rodzaj źródła węgla i stopień napowietrzenia podłoża mają istotny wpływ na biosyntezę skleroglukanu.
2. Duży wpływ na wydajność biosyntezy polimeru ma wiek i wielkość inokulum.
3. Ilość syntetyzowanego polimeru zależy w dużej mierze od stosunku molowego źródła węgla i azotu w podłożu.

LITERATURA

- [1] Brigand G.: Scleroglucan, in *Industrial Gums* 3rd ed., Academic Press, New York, 1993, 461.
- [2] Cottrell I.W.: Industrial potential of fungal and bacterial polysaccharides, in *Fungal Polysaccharides*, Sanford P.A., Matsuda I. eds.; 1980 ACS Symposium Series 126.
- [3] Dunn G.M.: Nutritional requirements of microorganisms, *Comprehensive Biotechnology*, vol. 1, Moo-Young eds., 1985, 113.
- [4] Forage R.G., Harrison D.E.F., Pitt D.E.: Effect of environment on microbial activity, *Comprehensive Biotechnology*, vol. 1, Moo-Young eds., 1985, 253.
- [5] Kayser L.M.: 1979, U.S. Patent 3,495 990.
- [6] Prem P., Singh R., Whisler L., Tokuzen R., Nakahara W.: Scleroglucan an antitumor polysaccharide from *Sclerotium glucanicum*, *Carbohydrate Research*, 37, 1974, 245.
- [7] Rau A., Gura E., Olszewski E., Wagner F.: Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing, *Industrial Microbiology*, 9, 1992, 19.

BIOSYNTHESIS OF SKLEROGLUKAN BY *SCLEROTIUM SP.* STRAIN**S u m m a r y**

Production of extracellular polysaccharides by moulds depends on culture conditions, including composition of growth medium, aeration and other parameters. These factors influence microbial physiology and therefore often increase or decrease yield of biosynthesis. Our article reports studies on scleroglucan biosynthesis by *Sclerotium sp.* strain from culture collection of Institute of Technical Biochemistry, Technical University of Lodz, under submerged culture conditions, focused on selection of a carbon source and an optimal C/N ratio, as well as on dynamics of scleroglucan biosynthesis dependently on a size of inoculum. During 7- days incubation we obtain from 1 litre of growth medium, 8.6 g of scleroglucan at specific productivity 1.7 gram/gram of biomass and 29% conversion of sucrose to scleroglucan. ❧