

BIOSYNTETA ENZYMÓW KSYLANOLITYCZNYCH W HODOWLI GRZYBA BIAŁEGO ROZKŁADU

Phanerochaete chrysosporium

Ewa B. Górską¹, Kamila Wilgat², Stefan Russel¹

¹ Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

² Instytut Melioracji i Użytków Zielonych w Falentach

Streszczenie. Rozkład drewna w przyrodzie wywołany jest głównie przez grzyby „białej zgnilizny” z klasy *Basidiomycetes*, do których należy *Phanerochaete chrysosporium*. Celem pracy było zbadanie produkcji enzymów ksyłanolitycznych w hodowli *P. chrysosporium* w pożywce mineralnej Czapeka z dodatkiem słomy lub otrąb pszennych. Wyniki badań wykazały, że *P. chrysosporium* wytwarza enzymy ksyłanolityczne (endo-1,4- β -ksylanazę i β -ksylozydazę) w pożywce hodowlanej z dodatkiem obu substratów. Aktywność endo-1,4- β -ksylanazy i β -ksylozydazy zależy od temperatury i jest najwyższa odpowiednio w 70 i 60°C. Maksymalną aktywność obu enzymów stwierdzono w odczynie kwaśnym, pH = 4,6.

Słowa kluczowe: enzymy ksyłanolityczne, *Phanerochaete chrysosporium*

WSTĘP

Grzyby „białego rozkładu” kolonizują rośliny zielne i drzewiaste dzięki zdolności do enzymatycznego rozkładu ligniny, celulozy i hemicelulozy, podstawowych składników ściany komórkowej roślin [Abdul i in. 1997, Krajewski i Witomski 2003].

Rozkład związków drewna przez grzyby „białej zgnilizny” rozpoczyna się hydrolizą hemicelulozy i celulozy w tzw. metabolizmie pierwotnym. Uwalniane cukry proste potrzebne są do rozpoczęcia procesu delignifikacji [Krajewski i Witomski 2003].

Wyczerpanie w środowisku grzyba podstawowych pierwiastków biogenych, takich jak: azot, siarka, fosfor, potas, oraz łatwo dostępnych źródeł węgla i energii indukuje metabolizm wtórny, w którym degradacji ulega lignina [Podgornik i in. 2001, Krajewski i Witomski 2003]. Biosynteza enzymów lignolitycznych przez większość grzybów „białego rozkładu” stymulowana jest wysokim stopniem polimeryzacji i krystaliczności celulozy przy równocześnie niskiej zawartości cukrów prostych (1%) [Krajewski i Wi-

towski 2003]. Węglowodany takie jak: glukoza, fruktoza lub ksyloza są niezbędne w procesie delignifikacji. W wyniku ich rozkładu przez oksydazy powstaje H_2O_2 , który jest konieczny do aktywności enzymów lignolitycznych [Basu i in. 2002, Khalil 2002, Krajewski i Witomski 2003].

Grzyb *Phanerochaete chrysosporium* należy do klasy *Basidiomycetes* i jest zdolny do syntetyzowania enzymów hydro- i lignolitycznych [Herr i in. 1978, Copa-Patino i in. 1993, Castanares i in. 1995, Basu i in. 2002, Krajewski i Witomski 2003], w wyniku czego może kolonizować obumarłe pnie i gałęzie roślin drzewiastych. Wśród wytwarzanych przez *Ph. chrysosporium* hydrolaz są enzymy ksylanolityczne, które rozkładają hemicelulozy [Castanares i in. 1995, Janzen i in. 1995, Singh i in. 1995, Jiménez i in. 1997, Khalil 2002].

Hemiceluloza jest liniowym i rozgałęzionym heteropolimerem, zbudowanym z reszt D-ksylozy, L-arabinozy, D-mannozy, D-glukozy, D-galaktozy i kwasu D-galakturnonowego, połączonych ze sobą wiązaniami typu 1,4- β i 1,3- β [Krajewski i Witomski 2003]. W zależności od rodzaju jednostek cukrowych wyróżnia się kilka typów hemiceluloz: galaktoglukomannan, arabinoglukuronoksylian, glukomannan, arabinogalakatan i glukuronoksylian [Krajewski i Witomski 2003].

Enzymy ksylanolityczne to: endo-1,4- β -ksylanaza (EC 3.2.1.8), 1,4- β -ksylozydaza ksylanu (EC 3.2.1.37), α -D-glukuronidazy, α -L-arabinofuranozydazy (EC 3.2.1.55) i acetylosterazy (EC 3.1.1.6) lub acetyloksylanoesterazy [Krajewski i Witomski 2003].

Najistotniejszym enzymem w procesie rozkładu ksylanu jest endo-1,4- β -ksylanaza [Khalil 2002, Krajewski i Witomski 2003], która atakuje końce szkieletu ksylanów, odszczepiając krótkie oligomery, ksylobiozę i ksylozę. Drugim równie ważnym enzymem jest 1,4- β -ksylozydaza, która hydrolizuje uwolnione dimery do ksylozy [Krajewski i Witomski 2003].

Celem badań było określenie biosyntezy enzymów ksylanolitycznych (endo-1,4- β -ksylanazy i β -ksylozydazy) w hodowli *Ph. chrysosporium* w pożywce płynnej z dodatkiem otrąb i słomy pszennej oraz równocześnie wykazanie wpływu odczynu i temperatury na aktywność enzymów ksylanolitycznych w filtratach pochodowlanych.

MATERIAŁ I METODY

Do badań wybrano szczep *Ph. chrysosporium* pochodzący z kolekcji szczepów z Zakładu Mikrobiologii Rolniczej SGGW. Szczep przechowywano w temperaturze 4°C na skosach z podłożem skrobiowym [Burbianka i in. 1983].

Biosyntezę enzymów ksylanolitycznych *Ph. chrysosporium* oznaczano co trzy dni przez dwa tygodnie w filtratach pochodowlanych. W celu przygotowania inoculum badany szczep grzyba hodowano w kolbach Erlenmeyera (o poj. 500 ml), zawierających po 100 ml płynnej pożywki ziemniaczano-glukozowej, którą zaszczerpiono ośmioma kostkami podłoża ziemniaczano-glukozowego (1 × 1 cm) przerośniętego grzybnią. Hodowlę prowadzono przez dziesięć dni. Następnie pobrano 10 ml inoculum i wsiewano do zmodyfikowanej pożywki Czapeka o pH 6,0. Do pożywki dodawano równocześnie 1% pociętej słomy lub otrąb pszennych zamiast sacharozy. Hodowlę prowadzono w temperaturze 25°C przez piętnaście dni na wytrząsarce rotacyjnej (130 obr. \cdot min⁻¹).

Aktywność endo-1,4- β -ksylanazy oznaczano kolorymetrycznie według metody Ghose i Bisarii [1987], dokonując pomiaru ilości cukrów redukujących [Samogy 1952], uwolnionych w wyniku działania enzymu na 1% roztworu ksylanu z owsa. Za jednostkę

aktywności endo-1,4- β -ksylanazy przyjęto ilość enzymu, która w warunkach oznaczenia (pH = 4,5, temperatura 50°C, przez 30 minut) z 1% ksyłanu uwalnia 1 μ mol cukrów redukujących w przeliczeniu na ksylozę w ciągu 1 minuty.

Aktywność β -ksylozydazy mierzono kolorymetrycznie metodą Herra i in. [1978]. Za jednostkę aktywności 1,4- β -ksylozydazy przyjęto ilość enzymu, która w warunkach oznaczenia (pH = 5, temperatura 50°C, przez 30 minut) uwalnia 1 μ mol o-nitrofenolu z o-nitrofenylo- β -D-ksylozydu w ciągu 1 minuty.

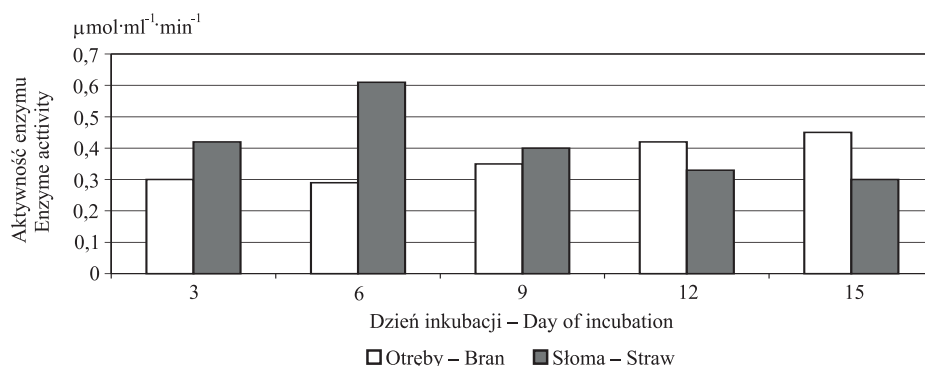
Wszystkie analizy wykonano w 3 powtórzeniach.

W doświadczeniach określających wpływ pH i temperatury na aktywność ksyłanazy jako źródło enzymów stosowano filtrat z dwutygodniowej hodowli grzyba w pożywce Czapeka z dodatkiem słomy. Wpływ pH na aktywność ksyłanaz oznaczano w zakresie pH od 3,8 do 5,8, stosując bufor octanowo-sodowy, a wpływ temperatury – inkubując mieszaninę reakcyjną w zakresie temperatury od 35 do 75°C.

W celu interpretacji uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem programu STATGRAPHICS 41.

WYNIKI I DISKUSJA

Mikroorganizmy dzięki biosyntezie różnych enzymów konstytutywnych i indukowanych biorą udział w rozkładzie różnorodnych związków chemicznych, przez co odgrywają podstawową rolę w obiegu pierwiastków w przyrodzie. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że lignolityczny szczep grzyba *Ph. chrysosporium* zaliczany do klasy *Basidiomycetes* wytwarza enzymy ksyłanolityczne – endo-1,4- β -ksylanazę i β -ksylozydazę w pożywce mineralnej z dodatkiem 1% siewki lub otrąb pszenicznych. Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała brak wpływu dodanych do pożywki hodowlanej substratów lignocelulozowych na produkcję endo-1,4- β -ksylanazy i pozytywny wpływ na produkcję drugiego badanego enzymu w hodowli *Ph. chrysosporium*. Na aktywność obu enzymów wpływa temperatura i odczyn. *Ph. chrysosporium* wytwarzał najwięcej endo-1,4- β -ksylanazy po 6 dniach hodowli w pożywce z dodatkiem słomy pszennej (0,61 μ mol·ml⁻¹·min⁻¹) (rys. 1).

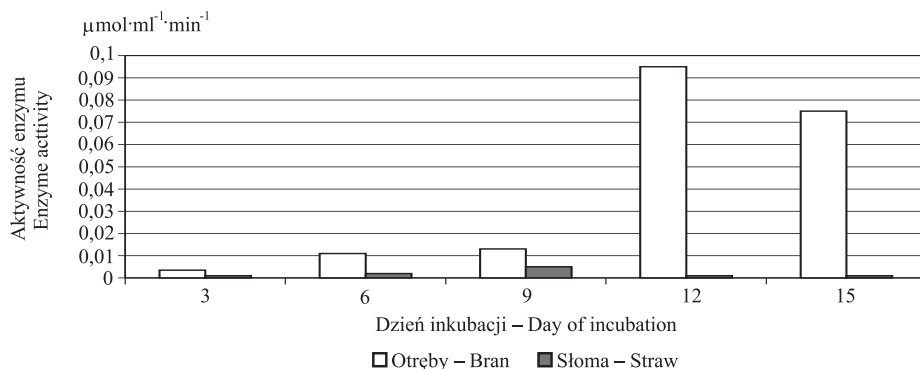


Rys. 1. Wpływ substratów lignocelulozowych na wytwarzanie endo-1,4- β -ksylanazy *Ph. chrysosporium*

Fig. 1. Effect of lignocellulosic substrates on the production of endo-1,4- β -xylanase by *Ph. chrysosporium*

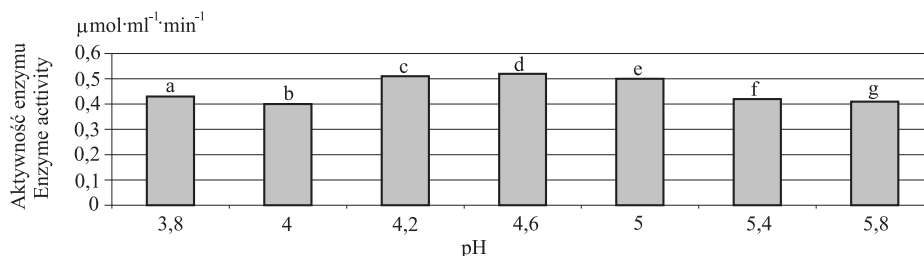
W miarę starzenia się hodowli produkcja enzymu zmniejszała się o 50% i 15. dnia trwania hodowli wynosiła $0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, podobnie jak 3. dnia inkubacji. Produkcja endo-1,4- β -ksylanazy w pożywce Czapeka z otrębami pszennymi podczas całego okresu hodowli kształtowała się na podobnym poziomie – $0,30\text{-}0,45 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (rys. 1).

Odwrotne relacje zaobserwowano podczas biosyntezy β -ksylozydazy przez *Ph. chrysosporium* (rys. 2). Badany szczep grzyba produkował więcej β -ksylozydazy w pożywce z dodatkiem otrąb pszennych niż słomy pszennej, odpowiednio $0,09$ i $0,005 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Maksimum produkcji β -ksylozydazy obserwowano 12. dnia w hodowli na otrębach, natomiast 6. dnia na słomie pszennej.



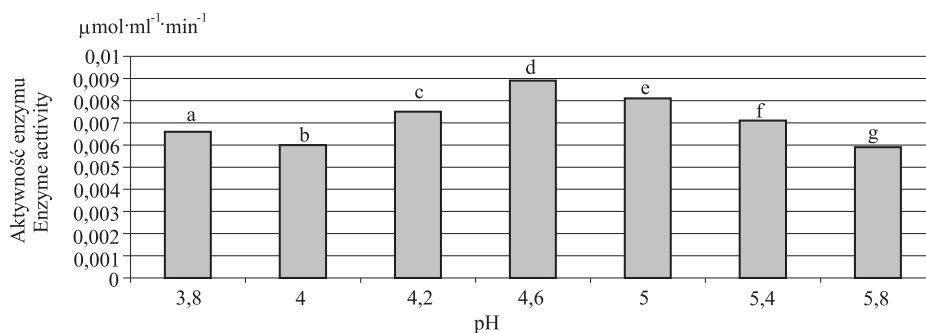
Rys. 2. Wpływ substratów lignocelulozowych na wytwarzanie 1,4- β -ksylozydazy *Ph. chrysosporium*
Fig. 2. Effect of lignocellulosic substrates on the production of 1,4- β -xylosidase *Ph. chrysosporium*

Doświadczenia prowadzone nad biosyntezą enzymów ksylianolitycznych przez *Ph. chrysosporium* BKM-F-1767 [Khail 2002] w pożywce z dodatkiem wyłoków z trzciny cukrowej potwierdzają wyniki badań własnych. Khalil [2002] wykazał, że produkcja badanych enzymów zależy od czasu trwania inkubacji, a w przypadku β -ksylozydazy była najwyższa 9. dnia hodowli ($0,004 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Według tego samego autora biosynteza endo-1,4- β -ksylanazy w pożywce była najwyższa 3. dnia inkubacji i wynosiła $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Szwedzono również, że optimum aktywności enzymów ksylianolitycznych zależy od odczynu i temperatury, co potwierdzają wyniki badań własnych (rys. 3-6).



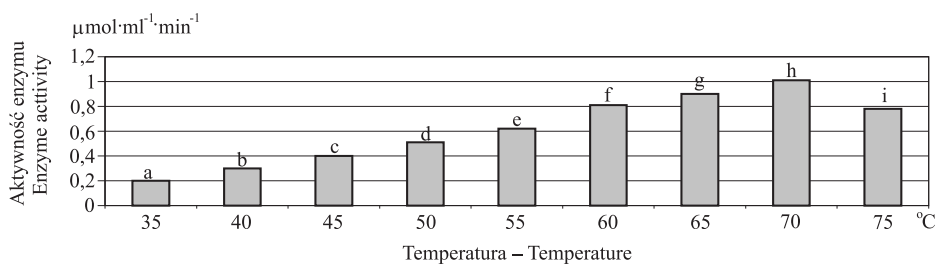
różnymi literami (a, b...) oznaczono średnie różniące się istotnie – mean significant differences are marked with different letters (a, b...) in figures

Rys. 3. Wpływ odczynu na aktywność endo-1,4- β -ksylanazy w hodowli *Ph. chrysosporium*
Fig. 3. Effect of pH on the activity of endo-1,4- β -xylanase produced by *Ph. chrysosporium*



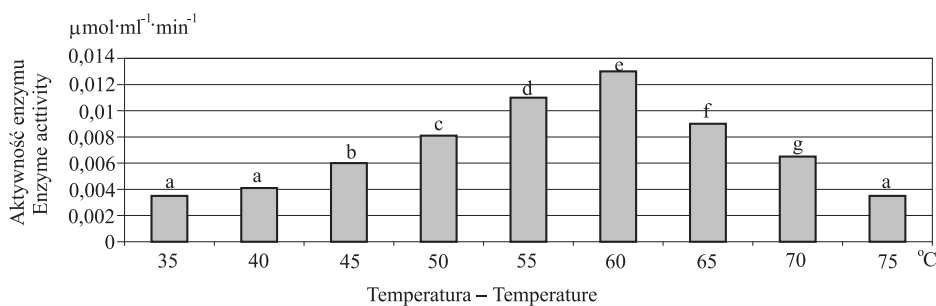
a, b... jak na rys. 3 – a, b... see Figure 3

Rys. 4. Wpływ odczynu na aktywność 1,4- β -ksylozydazy w hodowli *Ph. chrysosporium*
 Fig. 4. Effect of pH on the activity of 1,4- β -xylosidase produced by *Ph. Chrysosporium*



a, b... jak na rys. 3 – a, b... see Figure 3

Rys. 5. Wpływ temperatury na aktywność endo-1,4- β -ksylanazy w hodowli *Ph. chrysosporium*
 Fig. 5. Effect of temperature on the activity of endo-1,4- β -xylanase produced by *Ph. chryso-*
sporium



a, b... jak na rys. 3 – a, b... see Figure 3

Rys. 6. Wpływ temperatury na aktywność 1,4- β -ksylanazy w hodowli *Ph. chrysosporium*
 Fig. 6. Effect of temperature on the activity of 1,4- β -xylosidase produced by *Ph. chrysosporium*

Według Khalila [2002] endo-1,4- β -ksylanaza i β -ksylozydaza osiągają maksimum aktywności w pH = 5,0. Jego wyniki korespondują z uzyskanymi przez Copa-Patino

i in. [1993] w badaniach nad wpływem odczynu na aktywność ksylanaz *Ph. chrysosporium* ME-446.

Aktywność wszystkich enzymów, nie tylko ksylanaz, zależy od temperatury. Wpływ temperatury na aktywność ksylanaz *Ph. chrysosporium* przedstawiają rysunki 5 i 6. Endo-1,4- β -ksylanaza osiąga maksimum aktywności w 70°C, natomiast β -ksylozydazy w temperaturze 60°C. Podobne wyniki badań nad wpływem temperatury na aktywność β -ksylozydazy produkowanej przez *Ph. chrysosporium* BKM-F-1767 otrzymał Khalil [2002]. Wyniki uzyskane w badaniach własnych nie są zgodne z rezultatami doświadczeń prowadzonych nad grzybami *Phlebia radiata* przez Rogalskiego i in. [1993], którzy stwierdzili maksymalną aktywność ksylanaz w temperaturze 50°C, czyli zdecydowanie niższej od wykazanej w przedstawionej pracy (rys. 5, 6).

WNIOSKI

1. Grzyb *Phanerochaete chrysosporium* dzięki produkcji enzymów ksylanolitycznych bierze udział w mineralizacji obumarłych tkanek roślinnych, np. resztek poźniwnych, przez co wpływa na „obieg C w przyrodzie”.

2. Słoma pszenna okazała się wydajniejszym induktorem endo-1,4- β -ksylanazy niż otręby pszenne. Najwyższą aktywność tego enzymu stwierdzono po 6 dniach inkubacji *Phanerochaete chrysosporium* w pożywce hodowlanej z dodatkiem słomy pszennej.

3. Otręby pszenne wpływały stymulująco na biosyntezę β -ksylozydazy w porównaniu ze słomą pszenną.

4. Aktywność ksylanaz zależy od temperatury i odczynu. Optimum pH badanych enzymów wynosi 4,6, natomiast optimum temperatury – dla endo-1,4- β -ksylanazy 70°C, a dla β -ksylozydazy – 60°C.

PIŚMIENNICTWO

- Abdul El-Nasser N.H., Helmy S.M., El-Gammal A.A., 1997. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with white rot fungi. *Polymer Degradation and Stability* 62(2), 249-255.
- Basu S., Gaur R., Gomes J., Bisaria T.R., Virendra S., 2002. Effect of seed culture on solid-state bioconversion of wheat straw by *Phanerochaete chrysosporium* for animal feed production. *J. Biosc. Bioengineering*, 93(1), 25-30.
- Burbianka M., Pliszka A., Burzyńska H., 1983. *Mikrobiologia Żywności*. PZWL Warszawa.
- Castanares A., Hay A.J., Gordon A.H., McCrae S.I., Wood T.M., 1995. d-Xylan-degrading enzyme system from the fungus *Phanerochaete chrysosporium*: isolation and partial characterisation of an α -(4-O-methyl)-d-glucuronidase. *J. Biotechnol.* 43(3), 183-194.
- Copa-Patino J.L., Kim Y.G., Broda P., 1993. Production and initial characterisation of the xylan-degrading of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 69-76.
- Ghose T.K., Bisaria K.S., 1987. Measurement of hemicellulose activities. Part I. Xylanases. *IUPAC. Pure Appl. Chem.* 59, 1744-1746.
- Herr D., Baumer F., Dellweg H., 1978. Purification and properties of an extracellular B-glucosidase from *Lenzites trabea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 7, 29-36.
- Janzen R.A., Dormaar J.F., McGill W.B., 1995. A community-level concept of controls on decomposition processes: decomposition of barley straw by *Phanerochaete chrysosporium* or *Phlebia radiata* in pure or mixed culture. *Soil Biol. Biochemistry* 27, 173-179.

- Jiménez L., Martínez C., Pérez I., López F., 1997. Biobleaching procedures for pulp from agricultural residues using *Phanerochaete chrysosporium* and enzymes. *Process Biochem.* 21, 297-304.
- Khalil A.I., 2002. Production and characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes from the ligninolytic white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 753-759.
- Krajewski A., Witomski P., 2003 *Ochrona drewna*. Pod red. E. Ramus, Wyd SGGW w Warszawie.
- Podgornik H., Podgornik A., Milavec P., Perdih A., 2001. The effect of agitation and nitrogen concentration on lignin peroxidase (LiP) isoform composition during fermentation of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* 88, 173-176.
- Rogalski J., Hatakka A., Konga B., Leonowicz A., 1993. Hemicellulolytic enzymes of the lignolytic white-rot fungus *Phlebia radiata*, determination of enzymes activities. *Acta Biotechnol.* 13, 47-51.
- Samogy I.M., 1952. Notes of sugar determination. *J. Biol.Chem.* 195, 19-23.
- Singh A., Kuhad R.C., Kumar M., 1995. Xylanase production by a hyperxylanolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. *Enzyme and Microbial Technology* 17, 551-553.

BIOSYNTESIS OF XYLANOLITYC ENZYMES IN CULTURAL MEDIUM OF WHITE ROOT *Phanerochaete chrysosporium*

Abstract. Degradation of wood in nature is caused mainly by white rot fungus representing *Basidiomycetes*, such as *Phanerochaete chrysosporium*. The aim of this studies was to investigate the production of xylanolytic enzymes (endo-1,4- β -xylanase and β -xylosydase) by *Phanerochaete chrysosporium* cultivated on Czapek mineral medium to which straw or wheat bran was added. The results showed that *P. chrysosporium* produced both enzymes endo-1,4- β -xylanase and β -xylosydase in culture medium with the two substrates added. The activity of endo-1,4- β -xylanase and β -xylosydase depends on temperature and it is highest at 70 and 60°C. The maximum activity of both enzymes was found for the acid reaction, pH = 4.6.

Key words: xylanases, *Phanerochaete chrysosporium*

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 15.12.2006