

AKTYWNOŚĆ OKSYDAZY FENOLOWEJ (LAKAZY) I ENZYMÓW CELULOLITYCZNYCH W HODOWLI *Pleurotus ostreatus* 251 W POŻYWCE Z DODATKIEM RÓŻNYCH ODPADÓW LIGNOCELULOZOWYCH

Ewa B. Górska, Paulina Szczawińska, Stefan Russel

Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Katedra Nauk o Środowisku Glebowym,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wstęp

Odpady lignocelulozowe, które trafiają do środowiska naturalnego zawierają około 15–36% ligniny oraz znaczne ilości polisacharydów, takich jak celuloza, hemicelulozy i inne [BOLLAG, LEONOWICZ 1984; HONG-DUK YOUNG i in. 1995] nierozpuszczalnych w wodzie. Głównym ich źródłem jest przemysł rolniczy, młynarski, papierniczy, drzewny i inne.

Słoma roślin zbożowych jest jednym z ważniejszych odpadów rolniczych, która zawiera w suchej masie od około 30 do ponad 40% włókna surowego (głównie jest to lignina i celuloza). Słoma jako źródło ligniny i celulozy może być substratem do hodowli grzybów *Pleurotus ostreatus* wyspecjalizowanych w biosyntezie enzymów lignolitycznych, celulolitycznych i ksylanolitycznych.

Biodegradacja ligniny i celulozy w środowisku naturalnym, z racji ich budowy chemicznej, jest długotrwałym procesem enzymatycznym prowadzonym przez mikroorganizmy należące do różnych grup systematycznych [KOROLEVA i in. 2002; MASAPHY, LEVANON 1992].

Lignina jest polimerem jednostek fenolowych (alkohol koniferylowy, p-kumarylowy, alkohol sinapinowy) połączonych różnymi wiązaniami, w tym głównie wiązaniami gwajacylowoglicerolowo- β -aryloeterowymi (β -o-4), fenylo-kumarylowymi (β -5'), diarylopropanowymi (β -1'), pinorezynolowymi (β - β'), bifenolowymi (5-5') i difenyloeterowymi (4-0-5') [HONG-DUK YOUNG i in. 1995; BREEN, SINGLETON 1999; PEREZ i in. 2002]. Rozkład ligniny katalizowany jest przez różne enzymy lignolityczne, z których najważniejszym jest lakaza (oksydaza fenolowa, EC 1.10.3.2.) [HONG-DUK YOUNG i in. 1995; BREEN, SINGLETON 1999; PEREZ i in. 2002].

Do najaktywniejszych organizmów lignolitycznych należą grzyby białego rozkładu głównie z klasy *Basidiomycetes*. Do grupy tej zalicza się między innymi *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*, *Trametes versicolor*, *T. sanguinea*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Fomes annosus*, *F. fomentarius* i inne [BOLLAG, LEONOWICZ 1984; BREEN, SINGLETON 1999; HONG-DUK YOUNG i in. 1995; KOROLEVA i in. 2002; PEREZ i in. 2002]. Grzyby białego rozkładu również wykazują zdolność do produk-

cji enzymów hydrolitycznych takich jak celulazy, ksylanazy i inne [MASAPHY, LEVANNON 1992; LEVIN, FORCHASSIN 2001; PEREZ i in. 2002].

Celem niniejszych badań było określenie aktywności lakazy i enzymów celulolitycznych w hodowli *Pleurotus ostreatus* 251, w pożywkach płynnych z dodatkiem słomy z pszenicy, żyta, owsa, jęczmienia lub pszenżyta. Równocześnie podjęto próbę określenia wpływu warunków hodowli na aktywność badanych enzymów.

Materiał i metody badań

Do badań wybrano szczep *Pleurotus ostreatus* 251 pochodzący z kolekcji Forest Products College of Agriculture Chungbuk National University of Cheongju, Korea Południowa.

W celu określenia aktywności lakazy, ogólnej aktywności celulolitycznej (FP-aza) i karboksymetylocelulazy (CMC-aza) badany szczep grzyba hodowano w zmodyfikowanej pożywce płynnej Czapeka [BURBIANKA i in. 1983]. Modyfikacja polegała na zastąpieniu sacharozy 1% słomy z pszenicy (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare* – odmiana Korweta), żyta (*Secale cereale* ssp. *cereale* var. *vulgare* – odmiana Hegro), jęczmienia (*Hordeum vulgare* ssp. *distichon* – odmiana Orthega), pszenżyta (*Triticale* ssp. – odmiana Tornado) lub owsa (*Avena sativa* – odmiana Boryna) pociętej na kawałki o wymiarach od 3 do 5 cm.

Inoculum przygotowywano w kolbach Erlenmeyera o poj. 500 cm³ zawierających po 100 cm³ płynnej pożywki ziemniaczano-glukozowej [BURBIANKA i in. 1983]. W tym celu do pożywki tej dodawano 8 kostek podłoża ziemniaczano-glukozowego przerośniętego grzybnią (1 x 1 cm). Hodowle prowadzono na wstrząsarce rotacyjnej (150 obr./min), w temperaturze 26°C przez 10 dni. Dla badania aktywności lakazy i enzymów celulolitycznych szczep *P. ostreatus* 251 hodowano w kolbach Erlenmeyera o poj. 500 cm³, zawierających po 100 cm³ zmodyfikowanej pożywki płynnej Czapeka zaszczerpionej 10 cm³ inoculum. Hodowlę prowadzono w trzech powtórzeniach metodą stacjonarną i na wstrząsarce rotacyjnej (150 obr./min), w temperaturze 26°C przez 30 dni. Po 10, 20 i 30 dniach hodowli grzybnię i składniki stałe pożywki (słoma) oddzielano od płynu pohodowlanego przy użyciu lejka Schotta G1 z zestawem do filtracji próżniowej (kolba ssawkowa z próżniową pompką wodną). W przesączu oznaczano aktywność lakazy, FP-azy i CMC-azy.

Aktywność lakazy oznaczono zmodyfikowaną metodą wg LEONOWICZA i GRZYBOWICZA [1981] stosując jako substrat syryngaldazynę (4-hydroksy-3,5-dimetoksybenzaldehydu).

Za jednostkę aktywności lakazy (U) przyjęto taką ilość enzymu, która uwalnia 1 μmol produktów powstałych z utlenienia 1 μmol syryngaldazyny w ciągu 1 min., w warunkach oznaczenia (temp. 27°C, pH 5,0, czas reakcji 5 min.) w przeliczeniu na 1 mg białka rozpuszczalnego. Białko w płynie pohodowlanym oznaczono metodą Lowry'ego. Ogólną aktywność celulolityczną (scukrzającą) (FP-aza) oznaczono wg metody IUPAC [GRIESE 1987] poprzez pomiar cukrów redukujących, powstałych w wyniku enzymatycznej hydrolizy 50 mg bibuły filtracyjnej Whatman nr 1, zawieszonych w 0,05 mol·dm⁻³ buforze cytrynianowym (pH 4,8) w temp. 50°C w ciągu 60 min.

Za jednostkę aktywności enzymów scukrzających celulozę (U), przyjęto

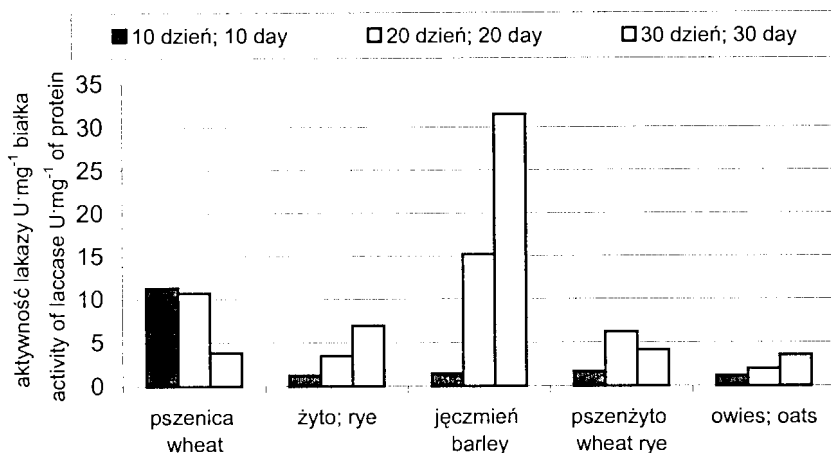
taką ilość enzymów, która w warunkach oznaczenia uwalnia 1 μmol cukrów redukujących w przeliczeniu na glukozę w ciągu 1 minuty. Cukry redukujące oznaczono metodą z odczynnikami DNS [MILLER 1959].

Aktywność karboksymetylocelulazy (CMC-azy) oznaczono wg metody IUPAC stosując jako substrat 2% roztwór karboksymetylocelulozy. Za jednostkę aktywności (U) przyjęto taką ilość enzymu, która w temp. 50°C i w pH 4,8 w czasie 30 minut uwalnia 1 μmol cukrów redukujących w przeliczeniu na glukozę w ciągu 1 minuty.

Wyniki i dyskusja

Biosynteza lakazy i enzymów celulolitycznych jak podaje literatura [LEONOWICZ, GRZYWNOWICZ 1981; BOLLAG, LEONOWICZ 1984; BREEN, SINGLETON 1999; TEKERE i in. 2001] zależy od wielu czynników, między innymi od szczepu grzyba, czasu hodowli, rodzaju substratu ligninocelulozowego, jak również warunków natlenienia hodowli (stacjonarna lub wytrząsana) i innych.

Aktywność lakazy wykazano w hodowli badanego szczepu *P. ostreatus* 251 w pożywce płynnej z dodatkiem siewki słomy roślin zbożowych, zarówno w warunkach stacjonarnych i podczas wytrząsania. Najwyższe aktywności lakazy wykazywały filtry po 30 dniach hodowli grzyba w pożywce z dodatkiem słomy jęczmiennej w warunkach stacjonarnych (32 U/cm³), (rys. 1). Na pozostałych substratach ligninocelulozowych dodanych do pożywki hodowlanej aktywność lakazy *P. ostreatus* 251 była niższa bez względu na czas prowadzenia hodowli i warunki natlenienia (rys. 1, 2).

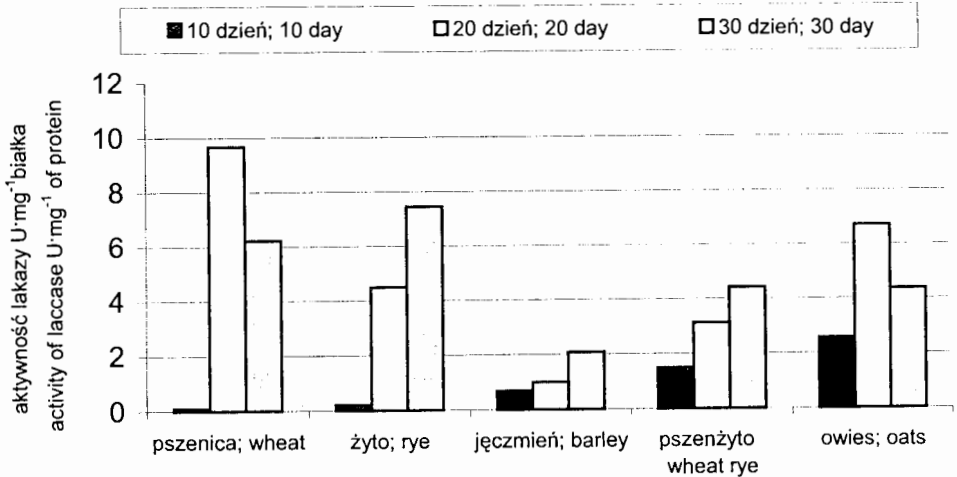


Rys. 1. Aktywność lakazy w hodowli *P. ostreatus* 251 w pożywce z dodatkiem słomy różnych roślin zbożowych w warunkach stacjonarnych

Fig. 1. Laccase activity of *P. astreatus* 251 growing in a medium amended with different cereal straw incubated under stationary conditions

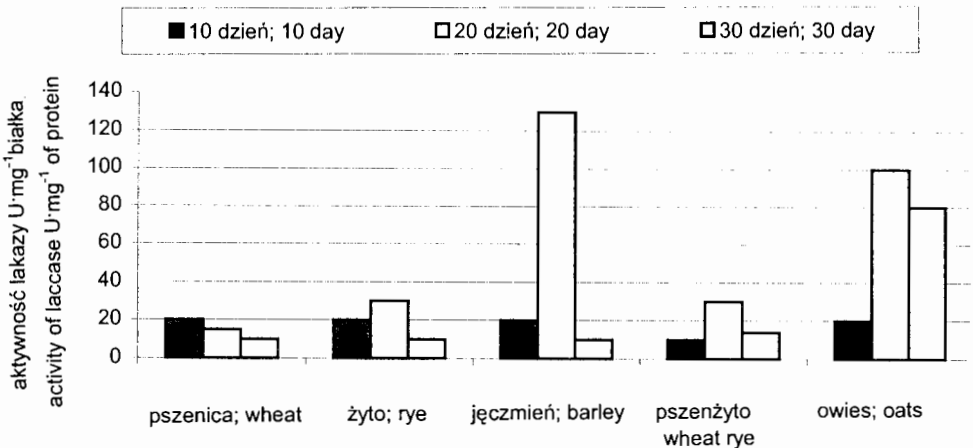
P. ostreatus 251 w hodowlach wytrząsanych wykazywał znacznie gorszy wzrost grzybnii, jak również niższą aktywność lakazy, niż w pożywce stacjonarnej, co koresponduje z wynikami badań BOLLAGA i LEONOWICZA [1984]. Wykazali oni,

że *P. ostreatus* i *T. versicolor* znacznie słabiej rośnie i biosyntetyzuje lakazę w hodowli wytrząsanej niż w stacjonarnej. Jedynie *Rhizoctonia praticola* dawała podobne aktywności lakazy bez względu na warunki hodowli (wytrząsanej i stacjonarnej) [BOLLAG, LEONOWICZ 1984]. Natomiast ORLY i in. [1996] uzyskali znaczne aktywności lakazy i dobry wzrost *P. ostreatus* w hodowli wytrząsanej stosując jako substrat pocięte lodygi bawełny.



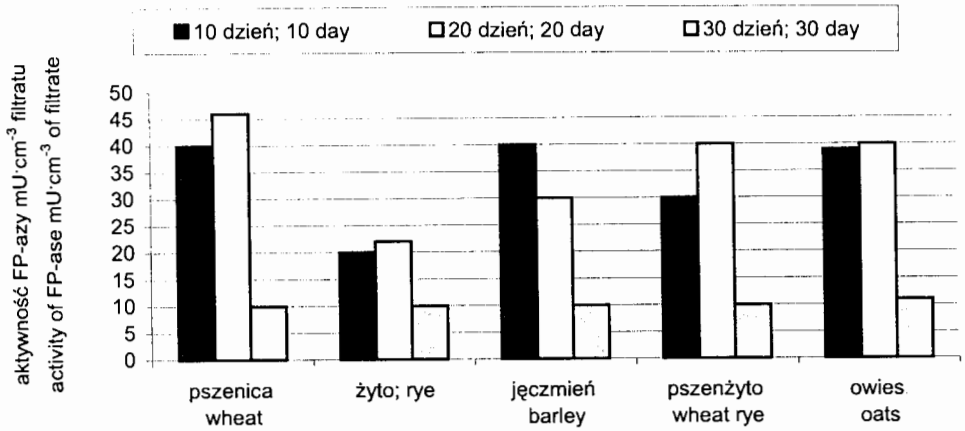
Rys. 2. Aktywność lakazy w hodowli *P. ostreatus* 251 w pożywce z dodatkiem słomy różnych roślin zbożowych w warunkach wytrząsanych

Fig. 2. Laccase activity of *P. astreatus* 251 growing in a medium amended with different cereal straw incubated under shaking conditions



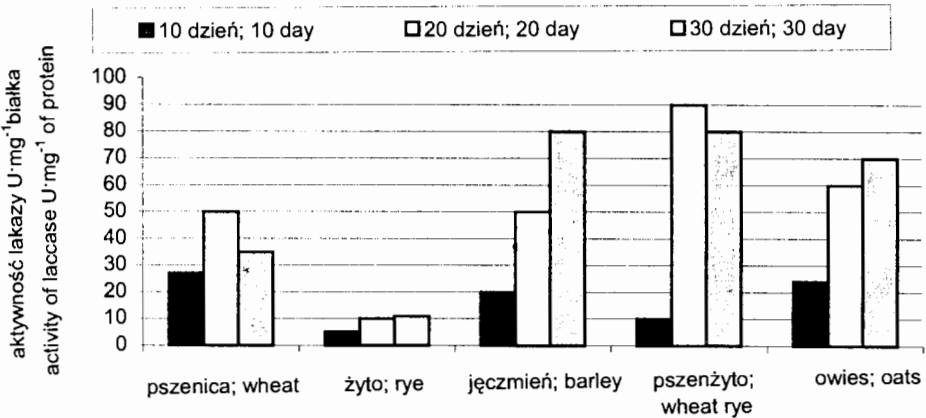
Rys. 3. Aktywność FP-azy w hodowli *P. ostreatus* 251 w pożywce z dodatkiem słomy różnych roślin zbożowych w warunkach stacjonarnych

Fig. 3. Laccase FP-azy of *P. astreatus* 251 growing in a medium amended with different cereal straw incubated under stationary conditions



Rys. 4. Aktywność FP-azy w hodowli *P. ostreatus* 251 w pożywce z dodatkiem słomy różnych roślin zbożowych w warunkach wyrzających

Fig. 4. Laccase FP-ase of *P. astreatus* 251 growing in a medium amended with different cereal straw incubated under shaking conditions



Rys. 5. Aktywność CMC-azy w hodowli *P. ostreatus* 251 w pożywce z dodatkiem słomy różnych roślin zbożowych w warunkach stacjonarnych

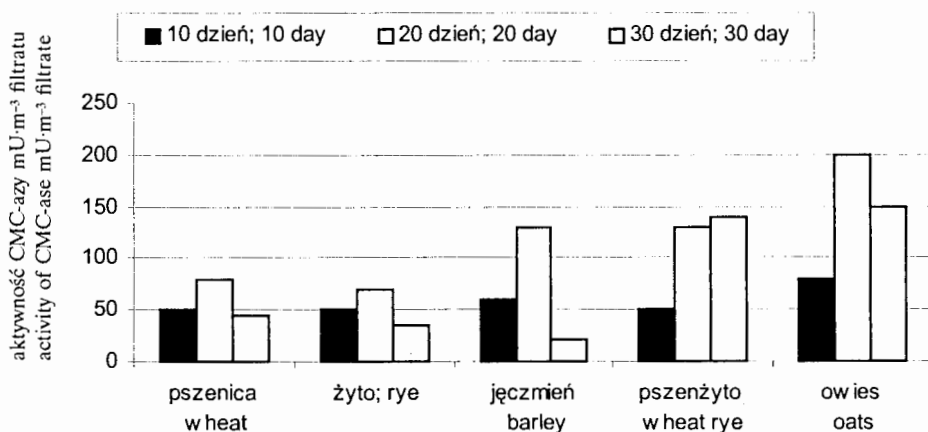
Fig. 5. Laccase CMC-ase of *P. astreatus* 251 growing in a medium amended with different cereal straw incubated under stationary conditions

Badania prowadzone przez SHI i in. [1997] nad biosyntezą lakazy przez *P. sajor-caju* szczep *pI-27* w pożywce płynnej z dodatkiem glukozy jako jedyne źródła węgla i energii, hodowany w warunkach stacjonarnych, wykazał najwyższą aktywność badanego enzymu już po 8 dniach inkubacji. Dodatek do pożywki hodowlanej L-asparaginy wpłynął pozytywnie na biosyntezę enzymu.

Z pracy TEKERE i in. [2001] oraz LEVINA i FORCHIASSINA [2001] wynika, że biosynteza lakazy przez grzyby z klasy *Basidiomycetes* była uzależniona od czasu hodowli. Badacze ci wykazali najlepszą aktywność lakazy po 10, 20 a nawet 25 dniach hodowli grzybów w temp. 28°C.

LEVIN i FORCHIASSIN [2001] badali wytwarzanie lakazy przez grzyb *Trametes trogii*. Grzyb ten był hodowany w warunkach stacjonarnych, w pożywce z glukozą, którą odpowiednio modyfikowano dodatkiem asparaginy. Dodatek asparaginy zwiększył aktywność lakazy z $0,23 \text{ U}\cdot\text{cm}^{-3}$ po 25 dniach inkubacji do $6 \text{ U}\cdot\text{cm}^{-3}$ po 20 dobach.

Filtraty po hodowli *P. ostreatus 251* w pożywkach z dodatkiem słomy różnych zbóż wykazywały aktywność FP-azy (rys. 3, 4) i CMC-azy (rys. 5, 6). Podobnie jak w przypadku lakazy aktywność tych enzymów była uzależniona od rodzaju słomy, doboru metody i czasu hodowli. Wyniki te zbliżone są do danych przedstawionych przez innych badaczy [MASAPHY, LEVANON 1992; LEVIN, FORCHIASSIN 2001; PEREZ i in. 2002], którzy prowadzili badania nad aktywnością celulolityczną grzybów.



Rys. 6. Aktywność CMC-azy w hodowli *P. ostreatus 251* w pożywce z dodatkiem słomy różnych roślin zbożowych w warunkach wytrząsanych

Fig. 6. Laccase CMC-ase of *P. astreatus 251* growing in a medium amended with different cereal straw incubated under shaking conditions

Wnioski

1. Szczep grzyba *P. ostreatus 251* wykazywał intensywniejszy wzrost w pożywkach z dodatkiem słomy różnych roślin zbożowych oraz wyższą aktywność lakazy w warunkach hodowli stacjonarnych niż w wytrząsanych.
2. Aktywność lakazy, enzymów scukrzających celulozę i aktywność karboksymetylocelulazy w płynach po hodowli grzyba *P. ostreatus 251* zależała od rodzaju słomy dodanej do pożywki, metody i czasu trwania hodowli.

Literatura

BOLLAG J.M., LEONOWICZ A. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. App. Environ. Microbiol. 48: 849–854.

- BREEN A., SINGLETON F.L. 1999. *Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping*. Environmental Biotechnol. 10: 251–258.
- BURBIANKA M., PLISZKA A., BURZYŃSKA H. 1983. *Mikrobiologia żywności*. PZWL Warszawa: 520 ss.
- GHOSE T.K. 1987. *Measurement of cellulase activities*. JUPAC, Pure Appl. Chem. 59: 257.
- HONG-DUK YOUNG, YUNG CHIL HAH, SA-OUK KANG 1995. *Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi*. FEMS Microbiol. Lett. 132: 183–188.
- KOROLEVA O., STEPANOVA E., GAVRILOVA V.P., YAKOVLEVA N.S., LANDESMAN E.O., YAV-METDINOV I.S., YAROPOL A. I. 2002. *Laccase and Mn-peroxidase production by Coriolus hirsutus strain 075 in a jar fermentor*. J. Biosc. Bioengineering 93: 449–455.
- LEONOWICZ A., GRZYWNOWICZ K. 1981. *Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate*. Enzyme Microb. Technol. 3: 55–57.
- LEVIN L., FORCHIASSIN F. 2001. *Ligninolytic enzymes of the white rot Basidiomycete Trametes trogii*. Acta Biotechnol. 21: 179–186.
- MASAPHY S., LEVANON D. 1992. *The effect of lignocellulase on lignocellulolytic activity of Pleurotus pulmonaries in submerged culture*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 828–832.
- MILLER G.L. 1959. *Use of dinitrosalicylic acidreagent for determination of reducing sugar*. Analy. Chem. 31: 426–428.
- ORLY ARDON, ZOHAR KEREM, YITZHAK HADAR 1996. *Enhancement of laccase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus Pleurotus ostreatus by cotton stalk extract*. J. Biotechnol. 51: 201–207.
- PEREZ J., RUBIA M.D.J., MARTINEZ J. 2002. *Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview*. Int. Microbiol. 5: 53–63.
- SHI YU FU, HUI-SHENG YU, BUSWELL J. 1997. *Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by Pleurotus sajor-caju*. FEMS Microbiol. Lett. 147: 133–137.
- TEKERE M., MSWAKA A.Y., ZVAUYA R., READ J.S. 2001. *Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi*. Enzyme Microbiol. Technol. 28: 420–426.

Słowa kluczowe: *Pleurotus ostreatus* 251, lakaza, enzymy celulolityczne

Streszczenie

Pleurotus ostreatus 251 wytwarza lakazę, FP-azę i CMC-azę rosnąc w pożywce z dodatkiem słomy z jęczmienia, pszenicy, żyta, owsa i pszenżyta zarówno w warunkach stacjonarnych i wytrząsanych.

Najwyższą aktywność lakazy wykazano w pożywce z dodatkiem słomy jęczmiennej jako jedynego źródła węgla w warunkach stacjonarnych.

Dodane do pożywki słomy roślin zbożowych były dobrym induktorem do wytwarzania FP-azy i CMC-azy przez *P. ostreatus* 251.

THE ACTIVITY OF PHENOLIC OXIDASE (LACCASE)
AND CELLULOLYTIC ENZYMES
OF *Pleurotus ostreatus* 251 GROWING
ON MEDIUM AMENDED WITH DIFFERENT
LIGNOCELLULOSE WASTES

Ewa B. Górka, Paulina Szczawińska, Stefan Russel
Department of Soil Environmental Sciences,
Warsaw Agricultural University, Warszawa

Key words: *Pleurotus ostreatus* 251, laccase, cellulolytic enzymes

Summary

Pleurotus ostreatus 251 was able to produce laccase, FP-ase and CMC-ase during growth on culture medium amended with barley, wheat, rye, oat and triticale straw both in stationary and shaking conditions.

The highest laccase activity was found after 30 days of incubation of the culture medium with barley straw as a single carbon source under the stationary conditions.

The investigated cereal straw appears to be also good substrates for FP-ase and CMC-ase production by *Pleurotus ostreatus* 251.

Dr inż. Ewa B. **Górka**
Katedra Nauk o Środowisku Glebowym
Zakład Mikrobiologii Rolniczej
Budynek 37
ul. Nowoursynowska 166
02-787 WARSZAWA
e-mail: e.b.gorska@wp.pl