

ROZKŁAD CELULOZY PRZEZ MEZOFILNE BAKTERIE GLEBOWE Z RODZAJU *Clostridium*

Khalifa Omar-El Haj, Ewa Beata Górska, Stefan Russel

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

Wstęp

Celuloza jest jednym z głównych biopolimerów, który trafia do środowiska przyrodniczego w znacznych ilościach wraz z obumarłymi tkankami roślin oraz produktami odpadowymi przemysłu spożywczego, rolniczego, drzewnego, młynarskiego i innych. Biokonwersja celulozy do cukrów prostych katalizowana jest przez trzy składniki celulazy: endo-1,4- β -D-glukanazę, exo-1,4- β -D-glukanazę oraz β -glukozydazę [BHAT, BHAT 1997; CHEW i in. 2001; SCHWARTZ 2001; IYIN i in. 2004]. W środowisku naturalnym rozkład celulozy prowadzony jest przez grupę fizjologiczną organizmów celulolitycznych [WEIMAR, ZEIKUS 1977; BHAT, BHAT 1997; LEE 1997].

W warunkach beztlenowych rozkład celulozy katalizowany jest przez bakterie, należące głównie do rodzaju *Clostridium* [FOND i in. 1983; LESCHINE, PAROLA 1983; SLEAT i in. 1984; RAM i in. 2001; RAVINDER i in. 2001]. Większość prac na temat rozkładu celulozy przez bakterie z rodzaju *Clostridium* dotyczy organizmów termofilnych głównie *Clostridium thermocellum* [WEIMER, ZEIKUS 1977; RAM i in. 2001]. Stosunkowo niewiele wiadomo na temat udziału przedstawicieli bakterii mezofilnych z rodzaju *Clostridium* w tym procesie [FOND i in. 1983; LESCHINE, PAROLA 1983].

Celulolityczne bakterie z rodzaju *Clostridium* wyizolowano z gleby, zwązwa, mułu, szlamu i ścicków. Bakterie fermentujące celulozę w warunkach mezo- i termofilnych wytwarzają różne metabolity, np.: glukozę, celobiozę, alkohole, kwasy organiczne i inne związki chemiczne, przez co kształtują właściwości biotyczne i abiotyczne zasiedlanych środowisk. Celulazy syntetyzowane przez bakterie z rodzaju *Clostridium* są powszechnie stosowane w produkcji żywności, w żywieniu zwierząt, w przemyśle tekstylnym, papierniczym, farmaceutycznym, rolniczym, utylizacji odpadów celulozowych, w inżynierii genetycznej do otrzymywania protoplastów i in.

Celem pracy było zbadanie wytwarzania enzymów celulolitycznych przez wyizolowane z gleby mezofilne szczepy bakterii z rodzaju *Clostridium* oraz określenie produktów fermentacji celobiozy, celulozy amorficznej i krystalicznej.

Materiał i metody

Do badań wybrano trzy szczepy bakterii: *Clostridium celerecrescens* (K1), *Clostridium sp. K-3* i *C. cellulolyticum* (K6), które wyizolowano z gleby płowej.

W celu określenia zdolności do produkcji pełnego kompleksu celulazy, wyizolowane szczepy bakterii hodowano w pożywce mineralnej CM3 [WEIMAR, ZEIKUS 1977] z dodatkiem paska bibuły filtracyjnej Whatman Nr 1 jako jedyne źródła węgla w temp. 28°C. Warunki beztlenowe uzyskano przez płukanie pożywki azotem cząsteczkowym. Jako indykator natlenienia do pożywki dodano rezazurynę. Po upływie 3, 5, 7, 14 i 21 dni inkubacji hodowle wirowano a następnie w supernatancie określono całkowitą aktywność celulolityczną (FP-azę), karboksymetylocelulazę (CMC-azę) oraz celobiazę. Aktywność enzymów celulolitycznych oznaczono metodami zalecanymi przez Międzynarodową Komisję Biotechnologii [BERGMEYER, BERNT 1974; GHOSE 1987].

Jednostkę aktywności (U) badanych enzymów zdefiniowano jako ilość enzymu, która podczas rozkładu zastosowanych substratów w warunkach doświadczenia uwalnia ilość produktów równoważną 1 μ mol glukozy w ciągu 1 minuty, w przeliczeniu na 1 mg białka. Białko rozpuszczalne oznaczono metodą LOWRY'EGO [1951].

Do oznaczenia produktów fermentacji badane szczepy bakterii hodowano w warunkach beztlenowych w pożywce CM3 z dodatkiem celobiozy, mikrokrystalicznej celulozy sproszkowanej Avicel i bibuły filtracyjnej. Produkty fermentacji określano na chromatografie gazowym Hewlett Packard 5890 zaopatrzonym w płomieniowy detektor jonizacyjny (FID). W tym celu 1 μ l supernatantu wstrzykiwano na kolumnę chromatograficzną. Oznaczenie alkoholi prowadzono przy następujących parametrach chromatografu: temp. injektora i detektora odpowiednio 150°C i 220°C, temp. kolumny 120°C. Natomiast lotne kwasy tłuszczowe oznaczano przy temp. injektora i detektora 220°C i temp. kolumny 180°C. Jako gaz nośny zastosowano hel.

Omówienie wyników i dyskusja

Podstawowym pierwiastkiem strukturalnym wchodzącym w skład organizmów żywych jest węgiel, dlatego też procesy, które prowadzą do jego odzyskiwania z obumarłych szczątków roślin i zwierząt są bardzo ważne z punktu widzenia ochrony środowiska i ekologii. Rozkład martwej substancji organicznej, w tym polisacharydów prowadzony jest w środowisku naturalnym głównie przez wyspecjalizowane grupy fizjologiczne mikroorganizmów [WEIMAR, ZEIKUS 1977; BHAT, BHAT 1997; LEE 1997].

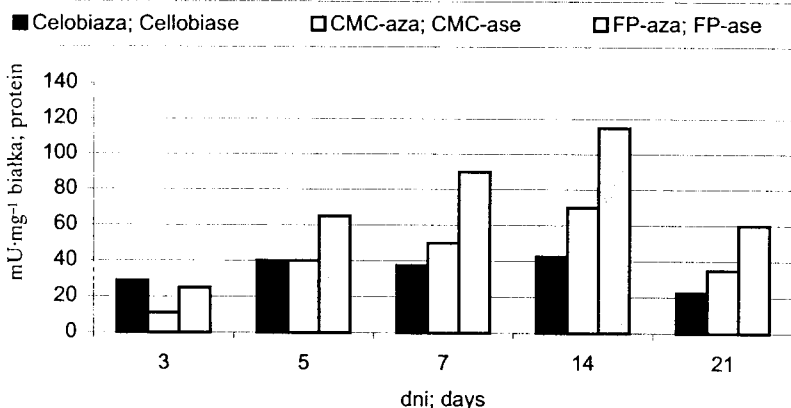
Bakterie z rodzaju *Clostridium* wykazują zdolność do beztlenowego rozkładu różnych związków organicznych, w tym polisacharydów, takich jak: celuloza, hemiceluloza, skrobia i inne [WEIMAR, ZEIKUS 1977; BHAT, BHAT 1997].

Mikrobiologiczne procesy rozkładu polisacharydów rozpoczynają reakcje hydrolityczne przeprowadzane przez *Clostridium sp.* dzięki takim enzymom hydrolitycznym jak celulaza, ksylanaza, amylaza i innym, które zlokalizowane są w powierzchniowych strukturach tzw. celulosomach [MURTY, CHANDRA 1991; LEVY, SSHOSEYOR 2002].

W niniejszej pracy wyizolowano z gleby szczepy bakterii z rodzaju *Clostri-*

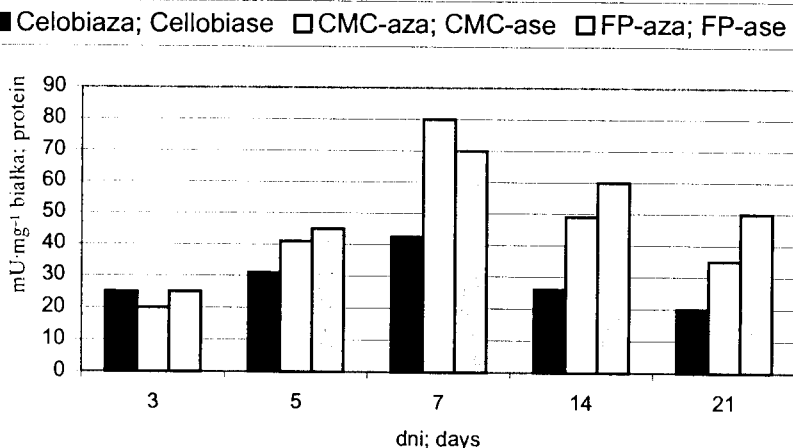
dium, które zidentyfikowano jako *C. celerecrescens*, *C. cellulolyticum* i *C. lentocellum*.

Badania enzymatyczne wykazały zdolność badanych szczepów bakterii z rodzaju *Clostridium* hodowanych w pożywce z dodatkiem bibuły filtracyjnej Whartman Nr 1. do biosyntezy pełnego kompleksu celulazy (rys. 1, 2, 3). Wszystkie badane szczepy wytwarzały endoglukanazę, egzoglukanazę i celobiazę.



Rys. 1. Produkcja enzymów celulolitycznych (CMC-azy, celobiazę, FP-azy) w hodowli *Clostridium celerecrescens*

Fig. 1. Production of cellulolytic enzymes (CMC-ase, Cellobiase, FP-ase) in the culture of *Clostridium celerecrescens*

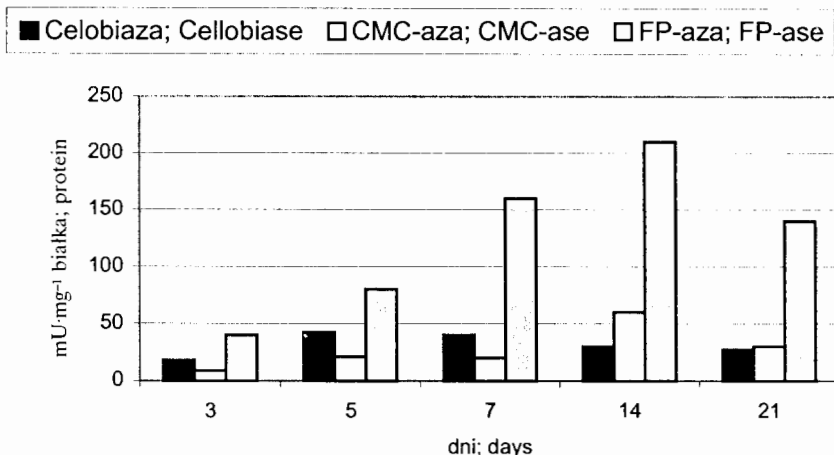


Rys. 2. Produkcja enzymów celulolitycznych (CMC-azy, celobiazę, FP-azy) w hodowli *Clostridium lentocellum*

Fig. 2. Production of cellulolytic enzymes (CMC-ase, Cellobiase, FP-ase) in the culture medium of *Clostridium lentocellum*

Hodowce szczepów *C. celerecrescens* (rys. 1) i *C. cellulolyticum* (rys. 3) wykazywały wysoką aktywność FP-azy, natomiast znacznie mniejszą aktywność CMC-azy i celobiazę. Najwyższą aktywność FP-azy i CMC-azy wykazano w hodowlach wysz-

tkich badanych szczepów bakterii po 7 i 14 dniach inkubacji. Szczep *C. cellulolyticum* (rys. 3) wytwarzał ponad 200 mU·mg⁻¹ białka FP-azy 14 dnia trwania hodowli, natomiast szczep *C. celerecrescens* (rys. 1) około 120 mU·mg⁻¹ białka. Tylko hodowle szczepu *C. lentocellum* (rys. 2) wykazywały po 7 dniach inkubacji wyższą aktywność CMC-azy (80 mU·mg⁻¹ białka) niż FP-azy (69 mU·mg⁻¹ białka). Badane szczepy wykazywały wyższą aktywność enzymów celulolitycznych w porównaniu z badaniami prowadzonymi nad aktywnością celulolityczną mezofilnych bakterii z rodzaju *Clostridium* przez MURTY i CHANDRA [1991]. Natomiast zbliżone aktywności do wykazanych w naszej pracy są przedstawione w badaniach nad mezofilnymi clostridiami prowadzone przez CAILLEZA i in. [1993].



Rys. 3. Produkcja enzymów celulolitycznych (CMC-azy, celobiazy, FP-azy) w hodowli *Clostridium cellulolyticum*

Fig. 3. Production of cellulolytic enzymes (CMC-ase, Cellobiase, FP-ase) in the culture medium of *Clostridium cellulolyticum*

Badania produktów fermentacji celobiozy, bibuły filtracyjnej i celulozy sproszkowanej Avicel przeprowadzono metodami chromatografii gazowej. Wykazały one różnice w kierunkach beztlenowego metabolizmu tych związków przez wyizolowane z gleby szczepy *Clostridium*. Badane szczepy *Clostridium sp.* w pożywce z dodatkiem celobiozy produkowały głównie kwas octowy, etanol i kwas masłowy, natomiast podczas wzrostu na bibule filtracyjnej wytwarzały kwas propionowy, etanol i kwas izowalerianowy (tab. 1). W hodowlach badanych szczepów bakterii podczas wzrostu na celulozie mikrokrystalicznej Avicel zidentyfikowano etanol, kwas octowy i kwas masłowy. We wszystkich kombinacjach wykrywano również śladowe ilości propanolu, butanolu i alkoholu N-amyłowego. Natomiast w badanych hodowlach nie wykryto metabolitów takich jak kwas walerianowy i metanol.

RAVINDER i in. [2001] wykazali, że *C. lentocellum SG6* produkował znaczne ilości kwasu octowego i alkoholu etylowego podczas beztlenowej hodowli w pożywce z celulozą. Ilość metabolitów była uzależniona od źródła azotu i zastosowanego gazu obojętnego w atmosferze której hodowano bakterie. Największe ilości głównych metabolitów stwierdzano w hodowlach w atmosferze azotu i w mieszaninie wodoru i dwutlenku węgla.

Tabela 1; Table 1

Produkty fermentacji celobiozy, bibuty filtracyjnej i celulozy mikrokrystalicznej Avicel w hodowli badanych szczepów *Clostridium*
 Products of fermentation of cellobiose, filter paper and Avicel microcrystalline cellulose by isolated strains of *Clostridium*

<i>Clostridium strains</i>	Produkty fermentacji (zawartość w mg/100 ml supernatantu) Products of fermentation (concentration in mg/100 ml of supernatant)										
	kwas octowy acetic acid	kwas propionowy propanic acid	kwas izowalериа- nowy isovaleric acid	kwas waleriano- wy valeric acid	kwas izomasłowy isobutyric acid	kwas masłowy butyric acid	metanol methanol	propanol propanol	butanol butanol	alkohol N-amylo- wy N-amył alcohol	etanol ethanol
Fermentacja celobiozy; Fermentation of cellobiose											
<i>Clostridium celerecrescens</i>	149,70	6,40	0,50	-	0,10	41,30	-	1,24	0,20	1,22	100,0
<i>Clostridium lentocellum</i>	185,60	-	0,80	-	0,40	32,60	-	-	-	3,14	40,0
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	166,90	0,40	1,20	-	0,5	2,60	-	1,32	0,14	4,91	80,0
Fermentacja bibuty filtracyjnej; Fermentation of filter paper											
<i>Clostridium celerecrescens</i>	-	70,0	35,8	-	4,4	-	-	1,40	0,27	0,94	40,0
<i>Clostridium lentocellum</i>	-	67,6	47,7	-	-	10,5	-	-	0,18	0,57	40,0
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	41,9	17,9	5,8	-	2,2	-	-	1,06	0,14	0,96	10,0
Fermentacja celulozy mikrokrystalicznej Avicel; Fermentation of Avicel microcrystalline cellulose											
<i>Clostridium celerecrescens</i>	14,90	3,50	1,10	-	-	25,60	-	1,52	0,62	5,78	100,0
<i>Clostridium lentocellum</i>	24,40	22,80	-	-	-	9,50	-	1,13	-	7,66	50,0
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	94,0	-	3,60	-	-	7,60	-	0,79	0,03	5,77	20,0

Dodatek do pożywki jako źródło azotu ekstraktu drożdżowego i peptonu stymulował rozkład celulozy przez badane bakterie. Podobne wyniki otrzymali RAM i in. [1991] w hodowlach *C. thermocellum* SS8 i *C. thermocellum* GS1.

Wyniki badań enzymatycznych zawarte w niniejszej pracy wykazały zdolność *C. celerecrescens*, *C. cellulolyticum* i *C. lentocellum* do mineralizacji zarówno celulozy krystalicznej jak i amorficznej do cukrów prostych i dalszą ich fermentację do kwasów i alkoholi. Można przypuszczać, że w środowisku naturalnym badane szczepy *Clostridium* również fermentują celulozę do takich związków jak: cukry proste, alkohole, kwasy i gazy, które wpłyną na właściwości biotyczne i abiotyczne zasiedlanego środowiska naturalnego.

Wnioski

1. *Clostridium lentocellum*, *C. cellulolyticum* i *C. celerecrescens* produkują pełny kompleks celulazy, dzięki czemu mogą rozkładać celulozę krystaliczną.
2. Najwyższą aktywność FP-azy wykazano w hodowlach badanych szczepów bakterii 7 i 14 dnia inkubacji.
3. Badane szczepy bakterii z rodzaju *Clostridium* fermentowały celobiozę i celulozę w pożywce hodowlanej głównie do kwasu octowego i alkoholu ctylowego.

Literatura

- BERGMEYER H.U., BERNT E. 1974. *Determination with glucose oxidase and peroxidase*, w: *Methods of enzymatic analysis*. W Bergmeyer H.U., wyd. 2, Academic Press, Inc. New York: 1205–1212.
- BHAT M.K., BHAT S. 1997. *Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications*. *Biotechnol. Adv.* 15: 583–620.
- CAILLET C., BENOIT L., GELHAYE E., PETITDEMANGE H., RVAL G. 1993. *Solubilization of cellulose by mesophilic, cellulolytic clostridia isolated from a municipal solid-waste digester*. *Biores. Technol.* 43: 77–83.
- CHEW I., OBBARD J.P., STANFORTH R.R. 2001. *Microbial cellulose decomposition in soils from a rifle range contaminated with heavy metals*. *Environ. Pollution* 111: 367–375.
- FOND O., PETITDEMANGE E., PETITDEMANGE H., ENGASSER J. 1983. *Cellulose fermentation by a coculture of a mesophilic cellulolytic Clostridium and Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. 13: 217–224.
- GHOSE T.K. 1987. *Measurement of cellulase activities*. *Pure Appl. Chem.* 59: 257–260.
- IYIN V.K., SMIRNOV I.A., SOLDATOV P.E., KORNIUSHENKOVA I.N., GRININ A.S., LYKOV I.N., SAFRONOVA S.A. 2004. *Microbial utilisation of natural organic wastes*. *Act. Astronautica* 54: 357–361.
- LEE J. 1997. *Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol*. *J. Biotechnol.* 56: 1–24.

- LESCHINE S.B., PAROLA E.C. 1983. *Mesophilic cellulolytic clostridia from fresh water environments*. Appl. Environ. Microbiol. 46: 728–737.
- LEVY I., SHOSEYR O. 2002. *Cellulose-binding domains biotechnological application*. Biotechnol. Adv. 20: 191–213.
- LOWRY O.H. 1951. *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. 265.
- MURTY M.Y.S., CHANDRA T.S. 1991. *Expression of xylanase and cellulase enzymes in a newly isolated Clostridium sp. SAIV*. Enzyme. Microb. Technol. 13: 430–435.
- RAM S.M., SWAMY M.V., SEENAYYA G. 2001. *Fermentation characteristics of ethanol producing isolates of Clostridium thermocellum*. Indian J. Microbiol. 31: 175–180.
- RAVINDER T., SWAMY M.V., SEENAYYA G., GOPAL R. 2001. *Clostridium lentocellum SG6- a potential organism for fermentation of cellulose to acetic acid*. Bioresource Technol. 80: 171–177.
- SCHWARZ W.H. 2001. *The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 634–649.
- SLEAT R., MAH R.A. 1985. *Clostridium populeti sp. Nov. a cellulolytic species from a woody biomass digester*. Int. J. Syst. Bacteriol. 35: 160–163.
- SLEAT R., MAH R.A., ROBINSON R. 1984. *Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, Clostridium cellulovorans sp. Nov.* Appl. Environ. Microbiol. 48: 88–93.
- WEIMER P.J., ZEIKUS J.G. 1977. *Fermentation of cellulose and cellobiose by Clostridium thermocellum in the absence and presence of Methanobacterium thermoautotrophicum*. Appl. Environ. Microbiol. 33: 289–297.

Słowa kluczowe: *Clostridium*, rozkład celulozy, celulazy, produkty fermentacji

Streszczenie

Celuloza w środowisku naturalnym podlega rozkładowi biologicznemu przez szeroką grupę fizjologiczną tzw. mikroorganizmów celulolitycznych. W warunkach beztlenowych przemiany celulozy są przeprowadzane przez przetrwalnikujące bakterie z rodzaju *Clostridium*. Literatura naukowa donosi głównie o rozkładzie celulozy przez termofilny szczep bakterii *C. thermocellum*. Nieliczne prace badawcze informują natomiast o rozkładzie celulozy prowadzonym przez mezofilne bakterie z rodzaju *Clostridium*.

W prezentowanej pracy wyizolowano trzy szczepy bakterii z rodzaju *Clostridium* i zbadano ich aktywność celulolityczną. Wyizolowane bakterie zidentyfikowano jako *C. celerecrescens*, *C. cellulolyticum* i *C. lentocellum*. Wszystkie wyizolowane szczepy bakterii produkowały FP-azę, CMC-azę i celobiazę. Podczas wzrostu w warunkach beztlenowych w pożywce z dodatkiem celobiozy, bibuły filtracyjnej i mikrokryształicznej celulozy Avicel jako jedyne źródło węgla oznaczono produkty fermentacji metodą chromatografii gazowej. Badane gatunki bakterii metabolizowały celobiozę i celulozę Avicel do kwasu octowego i masłowego oraz do etanolu. Natomiast bibułę filtracyjną do kwasu propionowego i izo-walerianowego i etanolu. We wszystkich badanych próbkach wykrywano śladowe ilości propanolu, butanolu i kwasu masłowego.

DECOMPOSITION OF CELLULOSE BY SOIL
ISOLATED MESOPHILIC BACTERIA STRAINS
OF THE GENERA *Clostridium*

Khalifa Omar-El Haj, Ewa Beata Górška, Stefan Russel
Department of Agricultural Microbiology,
Warsaw Agricultural University, Warszawa

Key words: *Clostridium*, degradation of cellulose, cellulase, products of fermentation

Summary

Cellulose can be biologically degraded by a wide range of microorganisms. Under anaerobic condition cellulose is transformed by spore-forming bacteria belonging to genera *Clostridium*.

Most papers dealing with anaerobic degradation of cellulose are connected with thermophilic bacteria *Clostridium thermocellum*. Only a few information could be found in literature about anaerobic transformation of cellulose by mesophilic clostridia.

In the present paper three strains of mesophilic, anaerobic, spore-forming bacteria were isolated from the soil and its cellulolytic activity was investigated. The isolated bacteria were identified as *Clostridium lentocellum*, *C. cellulolyticum* and *C. celerecrescens*. All isolated strains were able to produce FP-ase, CMC-ase and cellobiase. During the growth of investigated strains under anaerobic condition in medium amended with cellobiose, filter paper and Avicel microcrystalline cellulose as a sole carbon source the different fermentation products could be found using gas chromatography. Investigated bacterial strains metabolised cellobiose and Avicel cellulose mainly to acetic and butyric acids and ethanol, and filter paper to propionic and iso-valerianic acids and ethanol. In all investigated samples the trace amounts of propanol and butanol were also found.

Prof. dr hab. Stefan **Russel**
Katedra Nauk o Środowisku Glebowym
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
ul. Nowoursynowska 159
02-776 WARSZAWA
e-mail: russel@delta.sggw.waw.pl