

Uzdolnienia niektórych szczepów grzybów z klasy Basidiomycetes do biodegradacji celulozy i substratów lignocelulozowych

ZDZISŁAW TARGOŃSKI

Zakład Technologii Rolnej Akademii Rolniczej w Lublinie

Targoński Z.: (Department of Food Technology, Academy of Agriculture, 20-934 Lublin, Akademicka 13, Poland). *Ability of some species of fungi of the Basidiomycetes class to degrade cellulose and lignocellulose substrates*. Acta Mycol. 19 (2): 323-330, 1983.

Studies were carried-out on the ability of 18 strains of 15 white-rot and brown-rot basidiomycetons fungi to degrade wood components and to synthesize cellulolytic enzymes and laccase. 28,5% lignin and 26,1% carbohydrates of pine wood meal, 46,2% lignin and 67,8% carbohydrates of beech wood meal was degraded after 6 weeks incubation by the white-rot fungus *Phanerochate chrysosporium*. The highest activity of laccase was obtained in from fungi *Coriolus zonatus* and *Fomes fomentarius*.

WSTĘP

Do podstawowych składników drewna zalicza się: celulozę, hemicelulozy i ligninę. Polimery te są w różnym stopniu odporne na biodegradację. Hemicelulozy na ogół znacznie łatwiej ulegają enzymatycznej hydrolizie niż celuloza, ligninę zaś liczne gatunki grzybów rozkładają w minimalnym stopniu. Występowanie wymienionych składników drewna obok siebie w istotny sposób wpływa na przebieg ich biologicznej degradacji. Stwierdzono m.in. hamujący wpływ ligniny i jej pochodnych na przebieg degradacji celulozy (Vohra i in. 1980), a stymulujące oddziaływanie celulozy na biodegradację ligniny (Hiroi, Eriksson 1976).

Szczególną rolę w biodegradacji drewna przypisuje się grzybom powodującym białą i brunatną zgniliznę drewna. Fakt wykorzystywania składników drewna jako źródła węgla podczas wzrostu dał podstawę do rozpoczęcia badań mających na celu opracowanie technologii, których celem jest mikrobiologiczna produkcja białka w oparciu o substraty lignocelulozowe, otrzymywanie glukozy z celulozy, delignifikacja surowców lignocelulozowych w produkcji celulozy i papieru oraz innych.

Celem niniejszych badań było określenie uzdolnień 18 szczepów grzybów podstawkowych powodujących białą i brunatną zgniliznę drewna do biosyntezy enzymów celulolitycznych i lakazy, a także biodegradacji węglowodanów i ligniny zawartych w odpadach drzewnych.

MATERIAŁY I METODY

W badaniach wykorzystano 18 szczepów 15 gatunków grzybów wyższych powodujących białą i brunatną zgniliznę drewna (tab. 1). Wymienione szczepy znajdują się w kolekcji grzybów Zakładu Technologii Rolnej Akademii Rolniczej w Lublinie. Szczepy przechowywano na podłożu brzezka - agar w temperaturze 2°C.

Szybkość wzrostu poszczególnych gatunków i szczepów określano przez pomiar przyrostu średnicy kolonii w temperaturze 28°C na brzezce z agarem.

Zdolności do biosyntezy enzymów celulolitycznych określano przez hodowlę na pożywce mineralnej wg Andersa i Erikssona (1976) z 1% dodatkiem Munktell celulozy. Hodowlę prowadzono w temperaturze 28°C na wytrząsarce w kolbach Erlenmayera przez 2 tygodnie, po czym oddzielano grzybnię od płynu pohodowlanego i oznaczano w płynie aktywności endo- β -(1 \rightarrow 4)-glukanazy, FPA (filter paper activity) i lakazy. Zdolności badanych szczepów do syntezy enzymów celulolitycznych i lakazy na substratach lignocelulozowych oceniano przez hodowlę na zmielonych trocinach sosnowych metodą powierzchniową. W szalce Petriego umieszczano zawiesinę zawierającą 2% zmielonych trocin sosnowych o średnicy mniejszej niż 0,2 mm, zawieszonych w 1% roztworze brzezki. Całość inokulowano badanymi grzybami po uprzednim wysterylizowaniu podłoża. Oznaczenia aktywności enzymatycznej płynu pohodowlanego dokonano po 14 dniowej inkubacji.

Oznaczenie stopnia degradacji trocin przez grzyby. Do badań użyto zmielone trociny sosnowe i bukowe o średnicy mniejszej niż 0,2 mm. 0,5 g trocin umieszczano w płytce Petriego i dodawano 2,5 cm³ wody, sterylizowano w temperaturze 120°C przez 15 min. Następnie wprowadzano 2,5 cm³ wspomnianej pożywki z 0,2% dodatkiem asparaginy. Badane grzyby hodowano metodą powierzchniową przez 6 tygodni w temperaturze 28°C, a następnie oznaczano ubytek ligniny i węglowodanów.

Oznaczenie aktywności enzymatycznych. Aktywność endo- β -(1 \rightarrow 4)-glukanazy oznaczono wiskozymetrycznie z 0,5% roztworem soli sodowej karboksymetylocelulozy (Targoński, Szajer 1976). Aktywność FPA oznaczono metodą Mandels, Hortza i Nystroma (1974). Aktywność lakazy oznaczono w reakcji z gwajakolem (Hiroi, Eriksson 1976).

Zawartość ligniny i węglowodanów w trocinach. Zawartość ligniny oznaczono metodą Jayme a-Knollego (Modrzejewski, Olszewski, Rutkowski 1966). Ogólną zawartość węglowodanów w kwaśnym hydrolizacie po oddzieleniu ligniny oznaczono metodą fenolową (Mandels 1974).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wstępne badania szybkości wzrostu poszczególnych grzybów na podłożu brzezkowym wskazują na duże ich zróżnicowanie pod względem rozwoju. Najszybszym wzrostem charakteryzowały się szczepy *Phanerochaete chrysosporium*

Tabela 1 - Table 1

Pochodzenie materiału
Origin of material

Gatunek Species	Szczep Strain	Nr szczepu Strain No.	Gospodarz Host	Miejsce zbioru Place of harvesting
<i>Bjerkandera adusta</i> (Willd. ex Fr.) Karst.	M 74-244	F-1	<i>Picea abies</i>	Mantsala, Finlandia (Finland)
<i>Coriolus pubescens</i> (Schum. ex Fr.) Quél.	M 67-065	F-2	<i>Betula</i>	Muonio, Finlandia
<i>Cerrena unicolor</i> (Bull. ex Fr.) Murrill	M 74-257	F-3	<i>Betula</i>	Hollola, Finlandia
<i>Coriolus zonatus</i> (Nees ex Fr.) Quél	M 74-212	F-4	<i>Betula</i>	Espoo, Finlandia
<i>Fomes fomentarius</i> (L. ex Fr.) Kickx	M 74-308	F-5	<i>Betula</i>	Vihti, Finlandia
<i>Heterobasidium annosum</i> (Fr.) Bref.	F-72-201	F-6	<i>Alnus incana</i>	Heinola Finlandia
<i>Heterobasidium annosum</i> (Fr.) Bref.	F-72-197	F-7	<i>Picea abies</i>	Tunsula, Finlandia
<i>Fomitopsis pinicola</i> (Sw. ex Fr.) Karst.	M 72-232	F-8	<i>Picea abies</i>	Tunsula, Finlandia
<i>Gloeophyllum sepiarium</i> (Wulf. ex Fr.) Karst.	M 72-200	F-9	<i>Picea mariana</i>	Punkaharju, Finlandia
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull. ex Fr.) Bond.	M 70-162	F-10	<i>Salix fragilis</i>	Helsinki, Finlandia
<i>Piptoporus betulinus</i> (Bull. ex Fr.) Karst.	M 74-252	F-11	<i>Betula</i>	Espoo, Finlandia
<i>Polyporus arcularius</i> (Batsch) ex Fr.	M 70-169	F-12	<i>Alnus incana</i>	Vantaa, Finlandia
<i>Phellinus pomaceus</i> (Pers.) Maire	M 72-202	F-13	<i>Prunus sp.</i>	Espoo, Finlandia
<i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) Fr.	M 74-246	F-14	<i>Betula</i>	Vihti, Finlandia
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> Burdall	698-IV-75	F-15	-	-
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> Burdall	601-70-1	F-16	-	-
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> Burdall	698-I-71	F-17	-	-
<i>Paccilomyces varioti</i> Bainier	698-IV-74-1	F-18	-	-

(F-15, F-16, F-17), *Bjerkandera adusta* (F-1), *Coriolus zonatus* (F-4), *Polyporus arcularius* (F-12) (tab. 2).

Badania aktywności celulolitycznych płynów otrzymanych po hodowli wglębnej wskazują, że szczepy *P. chrysosporium* syntetyzowały w podłożu kilka a nawet kilkanaście razy więcej celulaz niż szczepy pozostałych grzybów, szczególnie jest to

Tabela 2 - Table 2

Szybkość wzrostu grzybów powodujących białą i brunatną zgniliznę na brzeczce z agarem w temperaturze 28°C

Rate of growth of white-rot and brown-rot fungi on malt-agar medium at 28°C

Szczepy Strains	Wzrost (mm/dobę) Growth (mm/day)	Szczepy Strains	Wzrost (mm/dobę) Growth (mm/day)
F-1	18	F-10	13
F-2	0,3	F-11	3
F-3	9	F-12	19
F-4	19	F-13	6
F-5	1	F-14	0,4
F-6	0,4	F-15	30
F-7	0,2	F-16	32
F-8	7	F-17	34
F-9	8	F-18	10

widoczne przy pomiarach aktywności endo- β -(1-4)-glukanazy (tab. 3). Najwyższą aktywność lakazy w warunkach prowadzonego doświadczenia wykazywały płyny po hodowli szczepów *Cerrena unicolor* oraz *Coriolus zonatus*, podczas gdy w płynach pohodowlanych szczepów *P. chrysosporium* aktywności lakazy nie stwierdzono.

Kilkakrotnie, a nawet kilkunastokrotnie wyższą aktywność lakazy w porównaniu do płynów otrzymanych po hodowli wglębnej na celulozie stwierdzono w płynach po hodowli powierzchniowej szczepów *Cerrena unicolor* (F-3), *Coriolus zonatus* (F-4), *Fomes fomentarius* (F-5) prowadzonej na trocinach (tab. 3). Aktywność celulolityczna w większości przypadków wykazywała tendencję odwrotną; również płyny po hodowli szczepów *P. chrysosporium* prowadzonej w podłożu z trocinami wykazywały niską aktywność endo- β -(1-4)-glukanazy. W tych hodowlach nie stwierdzono aktywności lakazy w warunkach prowadzonego doświadczenia.

Badania efektywności degradacji substratów lignocelulozowych na przykładzie zmieszanych trocin sosnowych i bukowych, w znacznym stopniu potwierdziły dotychczas poczynione obserwacje. Szczepy *P. chrysosporium* intensywniej rozkładały zarówno ligninę jak i węglowodany, aniżeli pozostałe szczepy, zarówno gdy

substratem były trociny bukowe jak sosnowe. Ubytek ligniny po 6-tygodniowej inkubacji szczepu *P. chrysosporium* F-16 w zmielonych trocinach sosnowych wyniósł 28,5%, a węglowodanów 26,1%. Jeszcze większy ubytek tych składników powodował wspomniany szczep w trocinach bukowych, a mianowicie: ligniny 46,2%, węglowodanów zaś 67,8%. Z pozostałych na uwagę zasługuje szczep F-1

Tabela 3 - Table 3

Enzymatyczna aktywność płynów pochodzących po 14 dniowej inkubacji grzybów
The enzymatic activity of culture filtrates after 14 days cultivation of fungi

Szczepy Strains	Aktywność endo- β - (1L4)- glukanazy (j/cm ³) Endo- β - (1L4)-glucanase activity (u/cm ³)		Aktywność wobec bibuły filtracyjnej (mg/0,5 cm ³ x h) Filter paper activity (mg/0.5 cm ³ x h)	Aktywność lakazy Laccase activity	
	a	b	a	*a	**b
F-1	0,3	0,2	0,0	-	+
F-2	0,1	0,8	0,0	-	++
F-3	2,4	0,4	0,02	+++++	+++++
F-4	2,1	0,25	0,1	++	+++
F-5	0,1	0,1	0,01	+	+++++
F-6	0,1	0,05	0,1	+	+++
F-7	0,0	2,5	0,0	+	-
F-8	0,1	3,2	0,1	-	-
F-9	0,0	0,5	0,05	-	+
F-10	0,1	0,2	0,16	-	++
F-11	0,0	0,1	0,01	-	-
F-12	0,6	0,2	0,15	+	+
F-13	0,5	0,1	0,03	-	++
F-14	0,1	0,1	0,14	+	++
F-15	28,0	0,5	0,42	-	-
F-16	40,0	0,25	0,68	-	-
F-17	7,8	0,2	0,26	-	-
F-18	0,1	0,1	0,12	-	-

a - metoda węglna na pożywce z 1% Munkell celulozy (submerged method on medium with Munkell's cellulose)

b - metoda stacjonarna na pożywce zawierającej 2% rozdrobnionego drewna sosnowego (stationary method on medium containing 2% pine wood meal)

* Aktywność lakazy wyznaczono wobec 1 cm³ płynu pochodzącego (laccase activity was determined with 1 cm³ culture filtrate)

** Aktywność lakazy wyznaczono wobec 0,1 cm³ płynu pochodzącego (laccase activity was determined with 0.1 cm³ culture filtrate)

+, ++, +++, +++++, ++++++ intensywność zabarwienia produktów utlenienia gwajakolu (extent of positive color reactions)

- brak reakcji barwnej (no color reaction)

grzyba *Bjerkandera adusta* silnie rozkładający zarówno trociny bukowe jak i sosnowe (tab. 4).

Na ogół szybkość degradacji ligniny była mniejsza niż węglowodanów, chociaż niektóre odmienne wyniki wymagają potwierdzenia w dalszych badaniach z racji

Tabela 4 - Table 4

Degradacja ligniny i węglowodanów w rozdrobnionym drewnie sosnowym i bukowym w czasie 6-tygodniowej inkubacji grzybów powodujących białą i brunatną zgniliznę

Degradation of lignin and carbohydrates in pine wood meal and beech wood meal after 6-weeks incubation of white-rot and brown-rot fungi

Szczepy Strains	Rozdrobnione drewno sosnowe Pine wood meal		Rozdrobnione drewno bukowe Beech wood meal	
	ubytek ligniny lignin loss %	ubytek węglowodanów carbohydr. loss %	ubytek ligniny lignin loss %	ubytek węglowodanów carbohydr. loss %
	F-1	20,9	36,0	27,9
F-2	6,8	26,0	12,6	-
F-3	12,0	10,0	9,7	6,6
F-4	8,6	10,8	29,8	28,8
F-5	9,0	1,5	11,5	7,7
F-6	12,6	27,7	33,9	-
F-7	6,2	18,3	9,6	5,5
F-8	4,0	6,0	7,6	14,3
F-9	7,7	14,0	0,8	4,6
F-10	3,8	4,0	1,4	3,6
F-11	8,5	19,6	6,2	15,1
F-12	9,1	34,0	22,9	14,7
F-13	5,9	20,6	5,7	34,6
F-14	10,6	21,3	19,3	46,0
F-15	19,8	17,9	41,0	68,6
F-16	28,5	26,1	46,2	68,8
F-17	15,2	27,7	44,6	69,9
F-18	3,7	1,3	1,0	1,1

niewielkich zmian w zawartości poszczególnych składników drewna w stosunku do kontroli. Szczególnie interesujące są wyniki świadczące o zbliżonej intensywności degradacji ligniny i węglowodanów wywołanych w trocinach sosnowych przez *P. chrysosporium*. Wskazują one na możliwość wykorzystania szczepów wymienionych grzybów do intensywnej delignifikacji substratów lignocelulozowych.

DYSKUSJA

W ostatnich kilkunastu latach biologiczną degradacją substratów celulozowych i lignocelulozowych zainteresowali się biotechnolodzy. Badania skoncentrowały się przede wszystkim na poszukiwaniu szczepów i ich mutantów syntetyzujących wysokoaktywne kompleksy enzymów celulolitycznych oraz na optymalizacji warunków biosyntezy enzymów i hydrolizy enzymatycznej celulozy. Za najlepszych producentów enzymów celulolitycznych uważa się obecnie mutanty szczepu *Trichoderma viride* QM 6a (Gallo i in. 1978). Z przebadanych w niniejszej pracy kolekcji szczepów grzybów wyższych szczep F-16 grzyba *P. chrysosporium* wykazywał aktywność FPA 4-6-krotnie niższą niż mutanty szczepu *T. viride* QM 6a.

Z uwagi na brak czystych surowców celulozowych praktyczne znaczenie w biotechnologii mają surowce lignocelulozowe. Wykorzystanie ich wymaga jednak ich wstępnego przygotowania metodami fizycznymi lub chemicznymi (Tiu-nowa 1981), usunięcia substancji inkrustujących w celu ułatwienia dostępu enzymom celulozowym do włókien celulozy. Dlatego od kilku lat prowadzone są badania mające na celu delignifikację surowców lignocelulozowych przez użycie drobnoustrojów rozkładających ligninę. Drobnoustrojami o tych uzdolnieniach są grzyby wywołujące białą zgniliznę drewna. Rozkład ligniny jest jedną z metod zwiększenia dostępu enzymom celulozowym do włókien celulozy i przyczynia się do zwiększenia efektywności enzymatycznej hydrolizy substratów lignocelulozowych. Podstawowym problemem jest znalezienie szczepów grzybów lub ich mutantów odznaczających się takimi cechami jak znaczna szybkość wzrostu i zdolność do intensywnej degradacji ligniny przy nieznacznej degradacji celulozy.

Ander i Eriksson (1977) wyodrębnili 2 grupy grzybów powodujących białą zgniliznę drewna, z których jedna grupa charakteryzowała się niską aktywnością endo- β -(1-4)-glukanazy w płynach pochodowlanych i wysoką aktywnością lakazy. Do drugiej grupy zaliczyli grzyby odznaczające się niską aktywnością lakazy i wysoką aktywnością endo- β -(1-4)-glukanazy. Wybrane szczepy z pierwszej grupy wykazywały większą skłonność do degradacji ligniny niż węglowodanów. Na podobne grupy można podzielić również grzyby będące przedmiotem obecnych badań.

Szybkość wzrostu i efektywność degradacji poszczególnych składników drewna przez grzyby w znacznym stopniu zależy od rodzaju substratu lignocelulozowego. Kirk i Moore (1972), a także Bergman i Nilsson (1966) wykazali, że drewna twarde są łatwiej rozkładane przez wybrane grzyby niż drewna miękkie.

Szybkość degradacji ligniny w stosunku do tempa rozkładu celulozy zależy od stężenia źródła azotu w pożywce. Stwierdzono, że 0,12% dodatek źródła azotu zwiększał efektywność degradacji ligniny, przekroczenie zaś dawki 1,2% azotu w stosunku do węgla w podłożu zwiększało nasilenie degradacji celulozy w stosunku do ligniny (Yang, Effland, Kirk 1980).

Ander i Eriksson (1975) uzyskali mutant szczepu *Sporotrichum pulverulentum* rozkładający ligninę, lecz nie powodujący hydrolizy celulozy. W celu uzyskania intensywnej degradacji ligniny należało do podłoża hodowlanego wprowadzić łatwo przyswajalne źródło węgla.

Z przebadanych przez Yanga, Efflanda i Kirka (1980) 50 szczepów wyselekcjonowano szczep *P. chrysosporium* Burds HHB 6251 charakteryzujący się znaczną szybkością wzrostu i selektywną degradacją drewna osiki. W optymalnych warunkach hodowli tego szczepu autorzy ci osiągnęli 3% ubytek ligniny na dobę w drewnie *Alnus acuminata*. Wykazano również, że drewno *Tsuga heterophylla* ulegało rozkładowi przez badany szczep, lecz około 5 razy wolniej niż drewno *Alnus acuminata*.

Z przedstawionych w niniejszej pracy danych wynika, że najlepszym z przebadanych szczepów okazał się szczep F-16 *P. chrysosporium*. Stwierdzono również, że trociny bukowe były bardziej podatne na biologiczną degradację przez ten szczep niż trociny sosnowe.

Z przeglądu literatury jak i badań własnych wynika, że szczepy *P. chrysosporium* można z powodzeniem zastosować w dalszych badaniach procesu delignifikacji.

LITERATURA

- Ander P., Eriksson K.E., 1975, Influence of carbohydrates on lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum* Svensk Papperstidn. 18: 643-652.
- Ander P., Eriksson K.E., 1976, The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Arch. Microbiol. 109: 1-8.
- Ander P., Eriksson K.E., 1977, Selective degradation of wood components by white-rot fungi. Physiol. Plant. 41: 239-248.
- Bergman Ö., Nilsson T., 1966, On outside storage of pine chips at Lövhölmens paper mill. Res. Notes R 53, Dep. Forest Prod., Roy Coll. Forest. Stockholm.
- Gallo B.J., Andreotti R., Roche C., Ryu D., Mandels M., 1978, Cellulase production by a new mutant strain of *Trichoderma viride* MCG-77. Biotechnol. Bioeng. Symp. 8: 89-101.
- Hiroi T., Eriksson K.E., 1976, Influence of cellulose on the degradation of lignin by the white-rot *Pleurotus ostreatus* Svensk Papperstidn 19: 157-161.
- Kirk T.K., Moore W.E., 1972, Removing lignin in wood with white rot fungi and digestibility of resulting wood. Wood and Fiber 4: 72-79.
- Mandels M., Hontz L., Nystrom J., 1974, Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. Biotechnol. Bioeng. 16: 1471-1493.
- Mandels M., 1974, Production and application of cellulase. Laboratory procedures. Natic 2-3.
- Modrzejewski K., Olszewski J., Rutkowski J., 1966, Metody badań w przemyśle celulozowo-papierniczym. Politechnika Łódzka, Łódź.
- Targoński Z., Szajer C., 1976, Synthesis of cellulase by *Fusarium* sp. in different culture conditions. Acta Microbiol. Pol. 26: 273-279.
- Tiunova N.A., 1981, Primienienie celulaz. Celulazy Mikroorganizmow. A.N. SSSR Izd. Nauka. 40-73.
- Vohra R.M., Shirkot G.K., Dhawan S., Gupta K.G., 1980, Effect of lignin and some of its components on production and activity of cellulase(s) by *Trichoderma viride* Biotechnol. Bioeng. 22: 1497-1500.
- Yang H.H., Effland M.J., Kirk T.K., 1980, Factors influencing fungal degradation to lignin in a representative lignocellulosic termomechanical pulp. Biotechnol. Bioeng. 22: 65-77.