

Anna ANTECKA, Michał BLATKIEWICZ, Marcin BIZUKOJĆ, Stanisław LEDAKOWICZ

e-mail: anna.antecka@p.lodz.pl

Katedra Inżynierii Bioprocusowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

Biosynteza lakazy w obecności mineralnych cząstek tlenku glinu w podłożu

Wstęp

Lakazy (EC 1.10.3.2, oksydazy p-dwufenolowe) należą do klasy oksydoreduktaz. Lakaza będąc enzymem o stosunkowo niskiej specyficzności substratowej posiada szerokie spektrum zastosowań w różnorodnych procesach, takich jak oczyszczanie ścieków przemysłowych, bielenie masy celulozowej, modyfikacja lnianych wyrobów włókienniczych, detoksyfikacja środowiska, produkcja etanolu i inne. To sprawia że stała się ona obiektem badań w wielu ośrodkach na świecie.

Cerrena unicolor, należąca do typu podstawczaków (*Basidiomycota*) i wywołująca białą zgniliznę drewna jest od wielu lat przedmiotem badań w Katedrze Inżynierii Bioprocusowej Politechniki Łódzkiej [Michniewicz i in., 2006; Anteck i Ledakowicz, 2009]. Główną zaletą tego szczepu jest fakt, iż produkuje lakazę samoistnie z podobną wydajnością jak inne gatunki grzybów pod wpływem induktorów [Rogalski i in., 1999]. Cecha ta czyni ją atrakcyjnym gatunkiem do badań związanych z produkcją tego enzymu.

Niestety naturalna wydajność biosyntezy enzymu w hodowli głębokiej nie zawsze jest zadowalająca. Natomiast z punktu widzenia zastosowań istotne jest takie prowadzenie procesu biosyntezy, żeby stężenie produktu było jak największe. W przypadku grzybów strzępkowych znaczący wpływ na syntezę metabolitów ma morfologia grzybni [Driouch i in., 2010]. W podejściu klasycznym do parametrów wpływających na morfologię grzybni zalicza się: zmianę liczby spor (inokulum), zmianę pH, zmianę prędkości obrotowej mieszadła, szybkości napowietrzania czy też zmianę typu bioreaktora. Natomiast w podejściu tzw. inżynierii morfologii wyróżnić należy: zmianę osmolarności brzezki hodowlanej, modyfikacje genetyczne, czy wreszcie dodatek mineralnych mikrocząstek [Krull i in., 2013]. Pozytywny wpływ mineralnych cząstek w podłożu na morfologię grzybni i aktywność enzymatyczną został potwierdzony badaniami eksperymentalnymi, szczególnie dla grzybów strzępkowych [Kaup i in., 2008; Bizukojć i Ledakowicz, 2009]. Zaobserwowano iż dodatek nieorganicznych mikrocząstek umożliwia sterowanie wielkością peletek powodując zmniejszenie ich średnicy oraz poprawę produktywności [Gonciarz i in., 2012].

W literaturze można znaleźć tylko nieliczne doniesienia ukazujące wpływ dodatku mineralnych cząstek nieorganicznych na biosyntezę różnych metabolitów przez grzyby *Basidiomycota*. Jednym z nich jest badanie optymalizacji produkcji lakazy przez *Trametes versicolor* na podłożu składającym się z różnych odpadów przemysłowych [Tisma i in., 2012]. Najlepsze rezultaty otrzymano na podłożu z odpadów z przemysłu papierniczego, gdy zawierały one duże ilości CaCO_3 . Niejako przypadkowo okazało się, że ten właśnie czynnik wyraźnie wpłynął na morfologię grzybni *T. versicolor* i produkcję lakazy. Potwierdzono jednocześnie pozytywny wpływ mikrocząstek obecnych w podłożu na wzrost i produkcję metabolitów przez grzyby *Basidiomycota*.

W związku z tym celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu obecności mineralnych cząstek tlenku glinu w podłożu hodowlanym na morfologię grzybni i produkcję lakazy przez *C. unicolor*.

Materiały i metody

Warunki prowadzenia hodowli

Szczep *Cerrena unicolor* pochodził z kolekcji Zakładu Biochemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie i był przechowywany na płytkach agarowych (2%). Do hodowli płynnej zastosowano zmodyfikowane podłoże wg Lindeberg i Holm [Janusz i in., 2007]. Tlenek glinu stosowany do badań pochodził z firmy Sigma-Aldrich i charakteryzował się wielkością mikrocząstek o średnicy 10 μm . Do

hodowli zastosowano następujące stężenia tlenku glinu: 5, 10, 15, 20, 30 g/dm^3 . Naważki zostały przygotowane osobno i sterylizowane w tych samych warunkach, co podłoże hodowlane. Zaszczepiano homogenizowaną grzybnią w ilości 5 ml na kolbę zawierającą 200 ml wysterylizowanego podłoża, dodawano odpowiednią naważkę tlenku glinu i umieszczano w szafie termostatującej do hodowli wstrząsanej *Certomat BS-1* firmy *B-Braun*. Hodowle prowadzono w temperaturze 28°C przez 10 dni przy stałej prędkości obrotowej mieszania 110 obr/min. W pierwszej fazie eksperymentu przebadano pięć stężeń tlenku glinu (5, 10, 15, 20 i 30 g/dm^3) oraz kontrolę. Pomiar aktywności i obserwacji biomasy wykonywano szóstego oraz dziesiątego dnia hodowli. Badania te pozwoliły na wyznaczenie stężeń optymalnych, które zostały dokładniej przebadane w drugiej fazie eksperymentu. Do kolejnych hodowli wykorzystano już tylko dwa stężenia tlenku glinu (15 i 30 g/dm^3). W tym przypadku próby pobierano częściej, to jest począwszy od pierwszego dnia hodowli do dnia dziesiątego w odstępach 24 godzinnych.

Metody analityczne

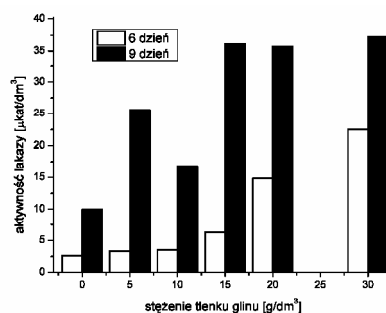
Aktywność zewnątrzkomórkowej lakazy oznaczano wobec syryngaldazyny [Leonowicz i Grzywnowicz, 1981] w buforze *McIlvaine'a* pH 5,6 przy długości fali 525 nm ($\epsilon_{525} = 65 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) na spektrofotometrze UV/VIS T80+.

W celu oznaczenia biomasy 30 ml zawiesiny przesączano przez filtry bibułowe 389 firmy *Filtrak* i przemywano 10-krotną ilością wody destylowanej. Biomasa suszono w temperaturze 105°C do suchej masy.

Obserwacje morfologii grzybni prowadzono głównie makroskopowo, ponieważ *C. unicolor* rośnie w kolbach wstrząsanych w postaci dosyć dużych peletek ok. 6 mm. W celu dokumentacji otrzymanych wyników niewielką ilość płynu pohodowlanego wraz z zawieszoną biomasą wylewano na płytki *Petrie*go i fotografowano.

Wyniki i dyskusja

Sprawdzenie wpływu tlenku glinu na wytwarzanie lakazy stanowiło pierwszą fazę eksperymentu. We wszystkich próbach już 6 dnia hodowli obserwowano aktywność enzymatyczną (Rys. 1), przy czym pozytywny wpływ dodatku tlenku glinu widoczny był dla stężeń począwszy od 15 g/dm^3 .



Rys. 1. Zależność aktywności lakazy od stężenia tlenku glinu

Dla trzech badanych stężeń wpływ cząstek mineralnych był proporcjonalny do ich początkowego stężenia w kolbach. Znacznie wyższe poziomy aktywności obserwowano 10 dnia hodowli ale w tym przypadku zależność aktywności od stężenia tlenku glinu ulegała zmianie. Stężenia 5 i 10 g/dm^3 poskutkowały odpowiednio 2,5 i 1,7-krotnym zwiększeniem aktywności, natomiast stężenia 15,

20 i 30 g/dm³ 3,5-krotnym. Z badań wynika, że powyżej wartości 15 g/dm³ dalsze zwiększanie stężenia tlenu glinu nie powoduje już dalszego wzrostu aktywności lakazy.

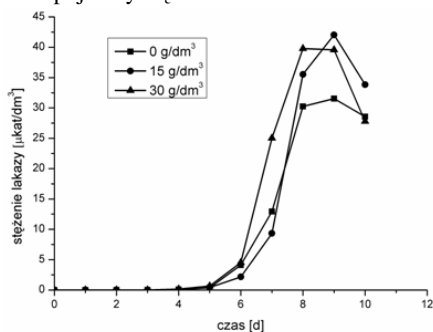
Z przeprowadzonych hodowli wynika, iż proces wzrostu grzybni w hodowlach z dodatkiem tlenu glinu (szczególnie dla stężeń powyżej 15 g/dm³) jest szybszy, a zatem i produkcja lakazy rozpoczyna się wcześniej niż w próbach bez tlenu glinu. Ponadto w próbach z mniejszą ilością tlenu glinu - stężenie do 15 g/dm³, zauważono całkowite wbudowanie cząstek mineralnych przez biomasę grzybni, natomiast w stężeniach 20 g/dm³ oraz 30 g/dm³ obserwowano pozostały, niewbudowany proszek w podłożu.

Dokładna obserwacja zmian aktywności lakazy w czasie hodowli oraz obserwacja uzyskanej biomasy stanowiła drugą fazę eksperymentu. Zakwalifikowano do niej dwa stężenia tlenu glinu:

- 15 g/dm³ jako stężenie optymalne ze względu na poziom aktywności produkowanej lakazy oraz ze względu na całkowite wbudowanie cząstek tlenu glinu przez biomasę,
- 30 g/dm³ ze względu na dobre wyniki aktywności enzymu w 6 dniu hodowli.

Dodanie do tych ilości tlenu glinu podłoża w drugiej fazie eksperymentu pozwoliło na dokładniejsze zbadanie, kiedy produkcja lakazy osiąga wartość maksymalną.

Z wykresu (Rys. 2) przedstawiającego zależność zmian aktywności lakazy w czasie wynika, iż niezależnie od stężenia tlenu glinu obserwuje się brak aktywności lakazy do 5 dnia hodowli. Szóstego dnia aktywność lakazy we wszystkich próbach zaczęła rosnąć, ale znaczące różnice pojawiły się 7 dnia hodowli.

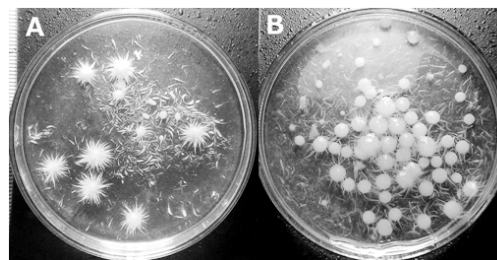


Rys. 2. Zmiany aktywności lakazy w czasie

Dla hodowli ze stężeniem tlenu glinu 30 g/dm³ zaobserwowano bardzo szybki wzrost aktywności. Aktywność lakazy przy tym stężeniu wzrastała szybciej niż w pozostałych dwóch próbach. Podobną zależność ukazującą przyspieszenie w czasie maksimum aktywności przy stężeniu 30 g/dm³ zaobserwowano także podczas wcześniejszego eksperymentu. Aktywność produkowanego enzymu osiągnąwszy 8 dnia hodowli swoją maksymalną wartość powoli zaczęła spadać.

W hodowli o stężeniu 15 g/dm³ podobny, szybki wzrost aktywności nastąpił pomiędzy 7 a 8 dniem hodowli. Maksimum aktywności lakazy przy tym stężeniu nastąpiło 9 dnia hodowli i jest to zarazem najwyższa aktywność uzyskana w tym eksperymencie.

Obserwacje makroskopowe rozwijającej się grzybni prowadzono równoległe podczas trwania hodowli, co obrazują zdjęcia przedstawione na rys. 3. Dla hodowli bez dodatku tlenu glinu (Rys. 3B) obserwowano gładkie, ewentualnie słabo owłosione peletki oraz nieliczne fragmenty grzybni rozproszonej. Średnica peletek wynosiła 2÷6 mm i była znacznie większa od średnicy peletek z hodowli z dodatkiem tlenu glinu. Dla hodowli ze stężeniem tlenu glinu 15 g/dm³ obserwowano peletki posiadające silnie owłosioną powierzchnię (*hairy pellets, star-shaped pellets*). Średnica peletek była wyraźnie mniejsza i wynosiła 1÷4 mm. Grzybnia hodowli ze stężeniem tlenu glinu 30 g/dm³ (Rys. 3A) rosła częściowo w postaci tzw. grzybni rozproszonej. Powstałe peletki były najbardziej rozgałęzione, posiadały charakterystyczną gwiazdźistą strukturę. Średnica peletek wynosiła 1÷3 mm.



Rys. 3. Biomasa *C. unicolor*: A) hodowla bez dodatku tlenu glinu, B) hodowla ze stężeniem tlenu glinu 30g/dm³.

Wnioski

Dodatek mikrocząstek tlenu glinu niezależnie od stężenia powoduje wzrost aktywności lakazy. Stężenie tlenu glinu 5 g/dm³ jest stężeniem efektywnym, natomiast stężenie 15 g/dm³ stężeniem optymalnym. Dalszy dodatek tlenu glinu powyżej stężenia 15 g/dm³ nie powoduje wzrostu aktywności lakazy a w płynie pohodowlanym obserwuje się niewbudowany proszek.

Wraz ze wzrostem stężenia tlenu glinu w podłożu obserwowano zmniejszenie wielkości peletek, ich powierzchnia stała się silniej owłosiona aż do uzyskania grzybni rozproszonej przy stężeniu 30g/dm³.

LITERATURA

- Antecka A., Ledakowicz S., 2009. Biosynteza lakazy i wzrost *Cerrena unicolor* w hodowli węgłnej. *Inż. Ap. Chem.*, **48**, nr 3, 21-22
- Bizukojc M., Ledakowicz S., 2009. The morphological nad physiological evolution of *Aspergillus terreus* mycelium in the submerged culture and its relations to the formation of secondary metabolites. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 41-54. DOI: 10.1002/bit.23313
- Driouch H., Sommer B., Wittmann Ch., 2010. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnol. Bioeng.*, **105**, 1058-1068. DOI: 10.1002/bit.22614
- Gonciarz J., Pawlak M., Bizukojc M., 2012. Wymuszanie zmian formy morfologicznej grzybni *Aspergillus terreus* poprzez dodatek nieorganicznych mikrocząstek. *Inż. Ap. Chem.*, **51**, nr 4, 123-124
- Janusz G., Rogalski J., Szczodrak J. 2007. Increased production of laccase by *Cerrena unicolor* in submerged liquid cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1459-1464. DOI: 10.1007/s11274-007-9390-y
- Kaup B.-A., Ehrich K., Pescheck M., Schrader J., 2008. Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example. *Biotechnol. Bioeng.*, **99**, 491-498. DOI: 10.1002/bit.21713
- Krull R., Wucherpfennig T., Eslahpazir Esfandabadi M., Walisko R., Melzer G., Hempel D., Kampen I., Kwade A., Wittmann C., 2013. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *J. Biotechnol* **163**, 112-123. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012
- Leonowicz A., Grzywnowicz K., 1981. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **3**, 55-58. DOI: 10.1016/0141-0229(81)90036-3
- Michniewicz A, Ullrich R, Ledakowicz S, Hofrichter M, 2006. The white-rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms with different physico-chemical and catalytic properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**, 682-688. DOI 10.1007/s00253-005-0015-9
- Rogalski J, Dawidowicz A, Józwick E, Leonowicz A, 1999. Immobilization of laccase from *Cerrena unicolor* on controlled porosity glass. *J. Mol. Cat. B: Enzym* **6**: 29-39. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2006.12.006
- Tišma M., Žnidarišič-Plazl P., Vasić-Rački D., Zelić B., 2012. Optimization of laccase production by *Trametes versicolor* cultivated on industrial waste. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **166**, 36-46. DOI: 10.1007/s12010-011-9401-1

Przedstawione badania realizowane były w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki nr UMO-2013/11/B/ST8/00337 pt. "Integracja procesów otrzymania i oczyszczenia lakaz grzybowych"