

Halina ZASŁONA, Anna TRUSEK-HOŁOWNIA

e-mail: halina.zaslona@pwr.edu.pl

Zakład Inżynierii Bioprocessowej i Biomedycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wroclaw

Mikrobiologiczne wytwarzanie białka o aktywności β -glukanazy**Wstęp**

Postępujący deficyt pierwotnych źródeł energii stał się problemem gospodarki światowej. Coraz więcej uwagi poświęca się poszukiwaniom alternatywnych nośników węgla, w szczególności tych zawartych w materiałach roślinnych, zastępujących szeroko wykorzystywane surowce węglowodorowe i karbochemiczne. Biomasa roślinna jest surowcem łatwo dostępnym, produkowanym w naturze w liczbie 160 mld ton rocznie [Burczyk, 2011]. W skład biomasy roślinnej wchodzi głównie α i β -glukany, jak również inne polisacharydy. Znaczna część polimerów cukrowych pochodzenia roślinnego jest słabo rozpuszczalna w wodzie i oporna na degradację.

Surowiec zazwyczaj poddaje się obróbce wstępnej [Dąbkowska i in., 2012] i następnie hydrolizie wymagającej zastosowania bardziej złożonych metod, w których wykorzystuje się roztwory kwasów lub enzymy. W wyniku działania kwasów mineralnych następuje rozpad kompleksu lignocelulozowego i hydrolizy celulozy oraz hemicelulozy do cukrów prostych. Stosowanie kwasów powoduje szereg niekorzystnych zjawisk, jak korozja aparatury, wysokie wartości parametrów procesowych (135÷230 °C, 10 atm) [Kim i in., 2001] oraz powstawanie produktów ubocznych działających hamująco w dalszym etapie przetwarzania monosacharydów (np. fermentacja alkoholowa).

Proces hydrolizy enzymatycznej w przeciwieństwie do hydrolizy chemicznej prowadzi się w łagodnych warunkach pH i temperatury, co kompensuje koszty zakupu drogich, wysoce oczyszczonych preparatów.

Wiele opracowań literaturowych wskazuje, że głównym problemem w hydrolizie enzymatycznej biomasy roślinnej jest jej niejednorodna kompozycja, wymagająca zastosowania szerokiej gamy białek enzymatycznych o różnej specyficzności substratowej. Wśród biopolimerów budujących strukturę roślin są celuloza, lignina, pektyny i hemicelulozy, ten ostatni tworzy najbardziej zróżnicowaną grupę. Hemicelulozy są złożonymi węglowodanami składającymi się z monosacharydów połączonych wiązaniami β -1,4, jak i β -1,3-glikozydowymi. Ich skład jest silnie uzależniony od rodzaju drewna. Do hemiceluloz wchodzących w skład drewna miękkiego należą polimery galaktoglukomannianu, glukomannianu i arabinoglukuronokylanu, a pozostałe to arabinogalaktan, ksylglukan i niektóre liniowe lub rozgałęzione β -1,3-glukany, jak kaloza i larycynian [Fengel i Wegner, 1989].

β -glukanazy są enzymami szeroko rozpowszechnionymi w świecie roślin, jak również produkowane są przez różne mikroorganizmy [Gueguen i in., 1997, Kulminkaya i in., 2001, Fibriansah i in., 2007]. Rola tych białek w roślinach wiąże się z procesami odpowiedzi na infekcje pasożytów [Jordan, 1993] oraz udziałem w cyklach fizjologicznych i procesach dojrzewania. Praktycznie β -1,3-glukanazy wykorzystywane są do przygotowania protoplastów, fuzji komórek, transformacji i ekstrakcji produktów białkowych [Parrado i in., 1996]. Stosowane są również w mieszankach pasz (enzymy paszowe) [Nuero i Reyes, 2002] oraz w przemyśle piwowarskim, jako składnik słoju [Bathgate i in., 1974].

W pracy przedstawiono biosyntezę białka o aktywności β -1,3-glukanazy w reaktorze mikrobiologicznym przez zmodyfikowany genetycznie szczep *E. coli*. Wskazano optymalne warunki prowadzenia procesu. Wyznaczono stałą szybkości reakcji preparatu oczyszczonego. Określono stabilność operacyjną enzymu będącą kluczowym parametrem dla potencjalnego zastosowania w procesie wielkotonazowym hydrolizy komponentów biomasy roślinnej.

Materiały i metody**Mikroorganizm**

W badaniach wykorzystano szczep *E. coli* BL21/pETSD10 transformowany plazmidem kodującym sekwencję genu gluB20-2 z *Sola-*

num tuberosum (ziemniak zwyczajny). Szczep otrzymano z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, Laboratorium Patogenezy Roślin w Warszawie. Hodowle bakteryjne prowadzono w pożywce LB [$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$]: pepton – 10; ekstrakt drożdżowy – 5; chlorek sodu – 5. Bakterie przechowywano na stałym podłożu LB (z agarem, $20\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$). Po sterylizacji (121 °C, 20 lub 40 min) pożywki ochłodzono, dodawano chloramfenikol i kanamycynę (czynniki selekcyjne) o końcowym stężeniu $50\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Metody analityczne

Pomiary OD komórek wykonywano przy długości fali 600 nm względem pożywki LB. Stężenie komórek wyznaczano na podstawie krzywej standardowej opracowanej metodą suchej masy o równaniu:

$$\text{OD}(600) = 0,4 C_{\text{biomasy}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}] \quad (1)$$

Stężenie białka określono za pomocą metody Lowry'ego i in. [1951], wykorzystując krzywą standardową dla albuminy wołowej o równaniu:

$$\text{OD}(750) = 2,273 C_{\text{białka}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}] \quad (2)$$

Aktywność β -1,3-glukanazową badano analizując stężenie produktu hydrolizy karboksymetylokurdlanu (*Megazyme*) o stężeniu $11,0\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ wykorzystując metodę DNS [Miller, 1959]. Reakcję prowadzono w stosunku objętości preparatu i substratu 7:1, w 28°C, przy pH 5,6.

Stężenie cukrów obliczano z krzywej standardowej wykonanej dla *D*-glukozy:

$$\text{Abs}(550) = 0,594 C [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}] - 0,033 \quad (3)$$

Za jednostkę aktywności (1 U g^{-1}) przyjęto uwolnienie $1,0\text{ mg}$ grup redukujących przez $1,0\text{ mg}$ białka w czasie 1 min w warunkach reakcji.

Hodowle w bioreaktorze

Inokulum przygotowano w 100 cm^3 pożywki LB w kolbach o pojemności 250 cm^3 na wytrząsarce obrotowej (37 °C, 120 rpm) do osiągnięcia $C_{\text{biomasy}}=2,0\text{-}2,5\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ (monitoring OD(600)). Proces hodowli komórek i indukcji prowadzono w reaktorze *BioFlo III* $3,0\text{ dm}^3$ (*New Brunswick Scientific*, USA), o pojemności roboczej $1,5\text{ dm}^3$ w temperaturze 37 °C do osiągnięcia stężenia biomasy $2,5\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Następnie do hodowli dodano czynnik indukujący (IPTG, izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozyd) o stężeniu końcowym $0,2\text{ mM}$. Indukcję prowadzono w temperaturze 18°C przez 23 h. Wzrost biomasy przebiegał w różnych warunkach mieszania, 60-180 rpm i natlenienia 0,5÷2,0 slpm (*Standard Liter per Minute*). Dodatkowe eksperymenty przeprowadzono dla wybranych granicznych wartości, które mogą być limitującymi dla prowadzenia hodowli: szybkość mieszania 0,25 i 3,0 slpm przy 60 rpm oraz dla 30 i 240 rpm przy 1,0 slpm.

Izolacja produktu

Po indukcji komórki oddzielono od medium przez wirowanie – 8000 rpm, 4°C, 10 min. Supernatant poddano analizie na obecność białka aktywnego, biomasę bakteryjną zamrożono do dalszej analizy. Izolację białka z zamrożonej biomasy przeprowadzono zgodnie z procedurą zawartą w pracy [Wojtkowiak i in., 2012]: biomasę zawieszono w buforze fosforanowym, pH 7,8 i poddano lizie komórek $1,0\text{ mM}$ PMS. Zawiesinę komórek sonikowano (*CarlRoth*, $5 \times 30\text{ s}$ z 5 s interwałami), mieszaninę odwirowano i wysalano siarczanem amonu(VI) przy 80% nasyceniu przez 10 h. Wysolone białka odwirowano i zawieszono w buforze fosforanowym pH 7,8 i prowadzono dializę

przez 10 h wymieniając w tym czasie bufor 2 krotnie. Otrzymany dializat odwirowano (9000 rpm, 30 min), następnie w supernatancie określono zawartość białka i oznaczono aktywność β -1,3-glukanazową.

Parametry kinetyczne

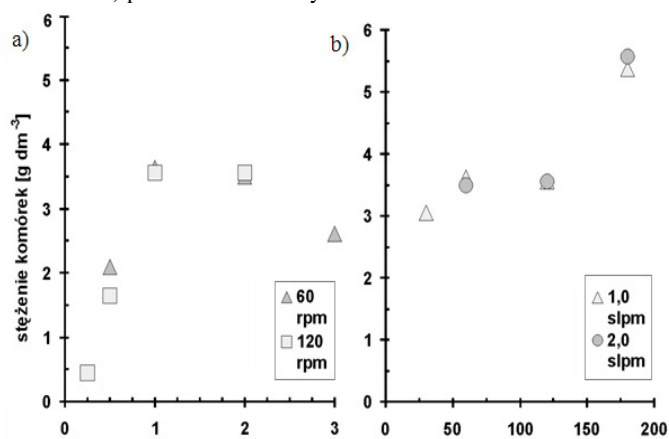
Kinetykę reakcji hydrolizy wiązań β -1,3-glikozydowych określono na podstawie pomiarów szybkości reakcji dla dwóch stężeń białka – 0,096 i 0,144 g·dm⁻³ i substratu (CM-kurdlanu, *Novozyme*) w zakresie stężeń 4,92÷11,08 g·dm⁻³. Badania prowadzono w 28 °C, w buforze fosforanowym o pH 5,6 [Witek i in., 2008]. Początkowe szybkości reakcji określano do momentu 10% konwersji dostępnych do hydrolizy wiązań. Maksymalny stopień konwersji określano po 20 i 30 h procesu. Test inaktywacji prowadzono przez 9 dni w 24 °C dla preparatu o stężeniu 0,144 g·dm⁻³ wykonując oznaczenia aktywności enzymatycznej w odstępach 24 godzinnych.

Wyniki i dyskusja

Oznaczenia zawartości białka metodą *Lowry'ego* potwierdziły znaczną ilość substratu proteinowego w pożywce LB (14,9 g·dm⁻³). Pod koniec hodowli okresowej stężenie białka w medium (12,7 g·dm⁻³) nieznacznie spadło, co może być wynikiem niepełnej utylizacji białka z pożywki i/lub zewnątrzkomórkowej produkcji białek. Na bazie przeprowadzonego testu na aktywność β -1,3-glukanazową, nie potwierdzono obecności enzymu w medium hodowlanym. Wynika stąd, że białko aktywne produkowane było wyłącznie wewnątrzkomórkowo i niezbędne było zastosowanie metod izolacji z biomasy.

Przy wielkotonażowym zastosowaniu preparatu β -1,3-glukanazy w procesach hydrolizy biomasy roślinnej nie jest wymagany znaczny stopień oczyszczenia i z uwagi na koszty niezalecany. Stąd preparaty uzyskane z hodowli poddano wyłącznie wstępnemu oczyszczeniu (zgodnie z poprzednio opisaną procedurą). Na podstawie pomiarów stężenia białka po wysalaniu i dializie uzyskano średnio 71,5% początkowej masy białka uwolnionej po sonikacji z komórek o aktywności 5,8 krotnie wyższej od aktywności preparatu wyjściowego.

Stężenia komórek *E. coli* po 23 h od czasu indukcji dla hodowli prowadzonych w bioreaktorze (przy różnym stopniu natlenienia i mieszania) przedstawiono na rys. 1.

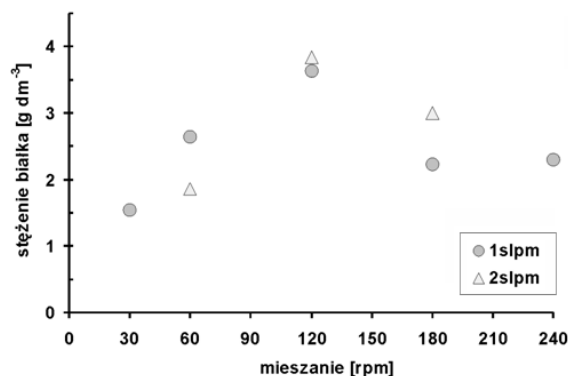


Rys. 1. Wpływ stopnia napowietżenia (a) oraz intensywności mieszania (b) na wzrost komórek *E.coli*

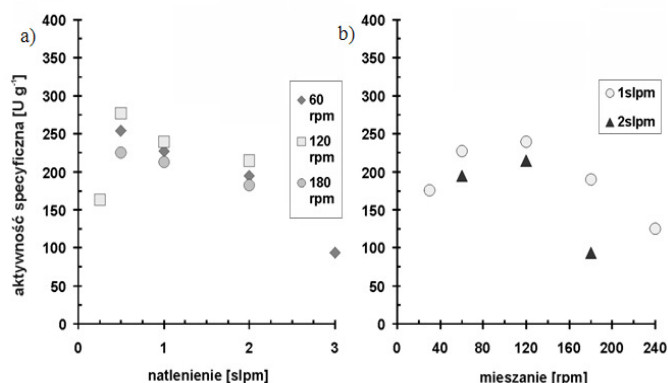
Z analizy wykresów wynika, że wzrost bakterii był silnie uzależniony od stopnia natlenienia. W zakresie 1,0÷2,0 slpm widoczne jest wyraźne optimum. Wzrost bakterii przy niskim stopniu natlenienia, 0,25 slpm wskazuje, że deficyt tlenu w pożywce znacznie ograniczył podziały komórkowe. Jak wynika z rys. 2. duża szybkość mieszania sprzyjała wysokim wartościom stężenia komórek, co może wynikać z ich rozbicia i zafalszowania wyniku analizy. Podobne zjawisko zostało zaobserwowane w hodowlach bakteryjnych mieszanych przy pomocy pompy odśrodkowej [Trusek-Holownia, 2011].

Wpływ stopnia natlenienia i intensywności mieszania na produkcję białek wewnątrzkomórkowych oraz aktywność właściwą w kierunku β -1,3-glukanazy przedstawiono na rys. 2 i 3. Niskie wartości szybko-

ści mieszania (30, 60 rpm) wpływały na niewielką produkcję białka w porównaniu z umiarkowaną intensywnością 120 rpm. Podobna zależność widoczna jest w aktywności specyficznej preparatów. Stężenie białka produkowanego w hodowlach mieszanych z szybkością 180 i 240 rpm potwierdzają powyższe obserwacje o prawdopodobnym uszkodzeniu komórek przy znacznej burzliwości przepływu.



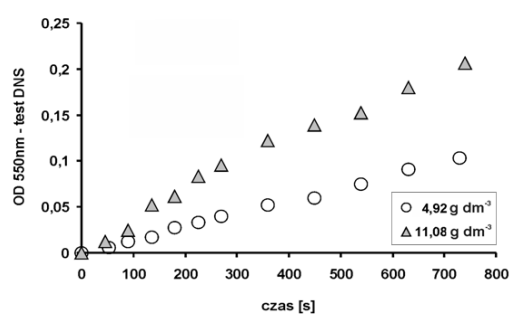
Rys. 2. Wpływ intensywności mieszania na produkcję białek wewnątrzkomórkowych przy napowietżeniu 1,0 i 2,0 slpm



Rys. 3. Wpływ intensywności mieszania (a) oraz stopnia napowietżenia (b) na aktywność specyficzną w kierunku β -1,3-glukanazy

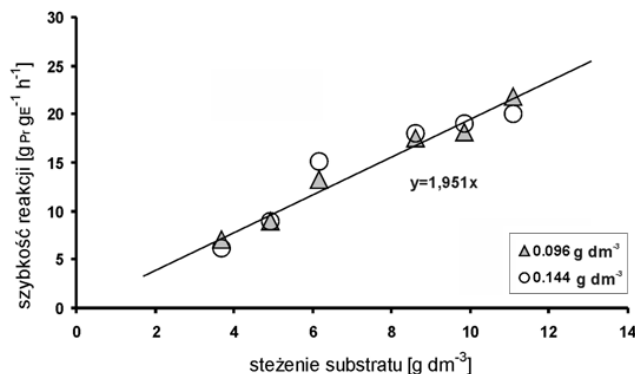
Aktywność specyficzną preparatu w kierunku właściwości β -1,3-glukanazowej spadała ze wzrostem stopnia natlenienia (Rys. 3a) w zakresie od 0,5 do 3,0 slpm. Jednak dalsze ograniczenie dostępności tlenu do 0,25 slpm powodowało przeciwny efekt, widoczny w spadku aktywności. Podobne wyniki uzyskano w badaniach nad produkcją rekombinowanych białek z udziałem zmodyfikowanego genetycznie szczepu *E. coli* [Tomazetto i in., 2007]. Autorzy cytowanej pracy wywnioskowali, że produkcja metabolitów zachodzi wydajniej przy ograniczonym dostępie do tlenu.

Badania kinetyczne w kierunku aktywności β -glukanazowej prowadzono z udziałem CM-kurdlanu. W trakcie procesu monitorowano przyrost absorbancji w teście DNS (Rys. 4).



Rys. 4. Postęp hydrolizy CM-kurdlanu o stężeniu 4,92 i 11,08 g·dm⁻³ (stężenie białka w preparacie enzymatycznym 0,1 g·dm⁻³, 28 °C, pH 5,6)

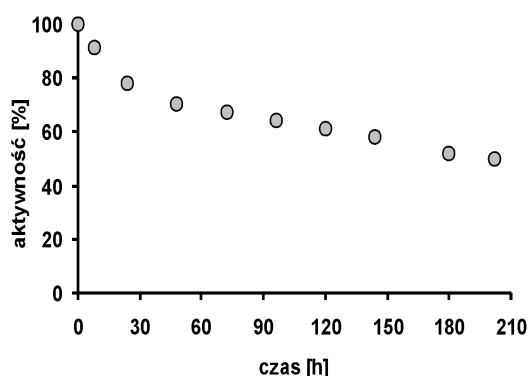
Jak widać na rys. 5 reakcja przebiegała zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu, względem stężenia substratu. W warunkach reakcji stała szybkości jest równa $1,95 \text{ dm}^{-3} \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Wytworzony enzym, jako endohydrolaza, do hydrolizy wiązania β -1,3 wymaga liniowego fragmentu o długości co najmniej 6 jednostek cukrowych, ale głównymi produktami aktywności tego białka są oligomery o długości 10 jednostek cukrowych [Carbohydrate-Active enZymes, 2015].



Rys. 5. Wpływ stężenia substratu (CM-kurdlan) na szybkość reakcji dla dwóch stężeń białka w preparacie enzymatycznym 0,096 i 0,144 g dm^{-3} ; Pr – produkt, E – enzym

Dla wykorzystywanego substratu – CM-kurdlanu, przeciętny stopień polimeryzacji był bliski 450, stąd można określić, że minimalny stopień hydrolizy tego polisacharydu powinien wynosić w przybliżeniu 10% (45 oligomerów cukrowych o długości 10 jednostek). Wydłużenie czasu działania enzymu do 20÷30 godzin pozwoliło na wyznaczenie maksymalnego stopnia konwersji substratu, który nie zmienił się w zależności od stężenia CM-kurdlanu. Średnia wartość konwersji była na poziomie 11,2%, co odpowiadało hydrolizie z uwalnianiem produktu o długości 9 jednostek cukrowych.

Preparat zbadano również pod kątem stabilności operacyjnej i możliwości zastosowania w procesie hydrolizy hemicelulozy. Białko charakteryzuje się niewielką utratą aktywności. Czas połowicznego zaniku aktywności następuje dopiero po upływie 8 dni (Rys. 6).



Rys. 6. Spadek aktywności β -glukanazowej w preparacie częściowo oczyszczonym

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań nad produkcją białka o aktywności β -1,3-glukanazowej można sformułować następujące wnioski:

- Białko aktywne produkowane jest wewnątrzkomórkowo i wymaga zastosowania metod izolacji z biomasy komórkowej.
- W badaniach zaobserwowano większy wpływ stopnia natlenienia na produkcję enzymu w porównaniu z szybkością mieszania.
- Niski poziom napowietrzania (0,5 slpm), powoduje niewielki przyrost biomasy i wysoką produkcję białek o aktywności β -1,3-glukanazy. Takie warunki hodowli dają korzystną zależność pomiędzy współczynnikami Y_{XS} i $Y_{P/S}$.

- Wstępnie oczyszczony preparat wykazuje wysoką aktywność właściwą i charakteryzuje się bardzo dobrą stabilnością operacyjną w warunkach reakcji ($t_{1/2} = 200 \text{ h}$)
- Produkty hydrolizy enzymatycznej mają w przybliżeniu 9 jednostek cukrowych. W myśl dalszego wykorzystania uzyskanych produktów w kierunku produkcji bioetanolu należałoby wykorzystać szczep fermentujący substrat o masie cząsteczkowej ok. 1,6 kDa lub przed fermentacją zastosować dodatkowo *egzo*-hydrolazy o aktywności β -1,3-glukanazy.

LITERATURA

- Bathgate G.N., Palmer G.H., Wilson G., 1974. The action of endo- β -1,3-glucanases on barley and malt β -glucans. *J Ind Brewing.*, **80**, 278–285. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1974.tb03617.x
- Burczyk B., 2011. *Biomasa. Surowiec do syntez i produkcji biopaliw*. Wyd. Pol. Wrocławskiej, Wrocław
- Carbohydrate-Active enZymes Database (03.2015) <http://www.cazy.org/>
- Dąbkowska K., Chmielewska I., Pilarek M., Szewczyk K.W., 2012. Wpływ metody wstępnej obróbki surowca lignocelulozowego na efektywność hydrolizy enzymatycznej. *Inż. Ap. Chem.*, **51**, 4, 112-114
- Fengel D., Wegener G., 1989. *Wood. Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter De Gruyter, Berlin, Germany
- Fibriansah G., Masuda S., Koizumi N., Nakamura S., Kumasaka T., 2007. The 1.3 Å crystal structure of a novel endo- β -1,3-glucanase of glycoside hydrolase family 16 from alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. strain F96. *Proteins*, **6**, 683–690. DOI: 10.1107/S0907444906037784
- Gueguen Y., Voorhorst W.G.B., Van der Oost J., De Vos W.M., 1997. Molecular and biochemical characterization of endo- β -1,3-glucanase of hyperthermophilic archeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 31258–31264
- Jordan B.R. 1993. *The molecular biology of flowering*. Redwood Books, Trowbridge, UK
- Kim S.J., Lee Y.Y., Torget W., 2001. Cellulose hydrolysis under extremely low sulfuric acid and high-temperature conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **91-93**, 331-340. DOI: 0273- 2289/01/91-93/0331/\$12.50
- Kulminkaya A.A., Thomsem K.K., Shabalin K.A., Sidorenko I.A., Eneyskaya E.V., Savalev A.N., Neustroev K.N., 2001. Isolation, enzymatic properties, and mode of action of an *exo*-1,3-glucanase from *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.*, **268** (23), 6123–6131. DOI: 10.1046/j.0014-2956.2001.02558.x
- Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol. Chem.*, **193**, 265-270 (05.2015) <http://devbio.wustl.edu/InfoSource/ISPDFs/Lowry%201951.pdf>
- Miller G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426–428
- Nuero O.M., Reyes F., 2002. Enzymes for animal feeding from *Penicillium chrysogenum* mycelial wastes from penicillin manufacture. *Lett Appl Microbiol.*, **34**, 413–416. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2002.01113.x
- Parrado J., Escuredo P.R., Conejero-Lara F., Kotik M., Ponting C.P., Asenjo J.A., Dobson C.M., 1996. Molecular characterization of a thermoactive β -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1296**(2), 145–151
- Tomazetto G., Mulinari F., Stanisquasi F., Settembrini B., Carlini C.R., Ayub M.A.Z., 2007. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticidal activity. *Enz. Microb. Technol.*, **41**, 821–827. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.07.006
- Trusek-Hołownia A., 2011. *Membrane Bioreactors – Models for Bioprocess Design*. Desalination Pub., USA
- Witek A.I., Witek K., Hennig J., 2008. Conserved Cys residue influences catalytic properties of potato endo-(1- \rightarrow 3)- β -glucanase GLUB20-2. *Acta. Biochim. Pol.*, **55**, 791–797
- Wojtkowiak A., Witek K., Hennig J., Jaskolski M., 2012. Two high-resolution structures of potato endo-1,3- β -glucanase reveal subdomain flexibility with implications for substrate binding. *Acta Cryst.*, **D68**, 713-723. DOI: 10.1107/S090744491200995X

Praca była współfinansowana ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na lata 2014-2018 dla Wrocławskiego Centrum Biotechnologii