

JOLANTA POLAK  
ANNA JAROSZ-WILKOŁAZKA

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

# Synteza barwników przez unieruchomioną biomasę grzybową

## Wstęp

Biotechnologia przemysłowa jest wiodącą technologią praktycznego zastosowania komórek lub ich komponentów do produkcji substancji chemicznych, tworzyw oraz artykułów powszechnego użytku. Właściwości katalityczne wielu enzymów z grupy oksydoreduktaz wykorzystane zostały w procesach technologicznych związanych z przemysłem tekstylnym, produkcją żywności oraz z diagnostyką medyczną [1, 2]. Niestety zarówno pozyskiwanie enzymów jak i ich stosowanie w procesach technologicznych jest nadal zbyt kosztowne. Alternatywą syntezy enzymatycznej może być zastosowanie całych komórek, jako biokatalizatora transformacji. Doskonałym przykładem biokatalizatorów komórkowych mogą być komórki grzybów należących do ekologicznej grupy grzybów białej zgnilizny drewna o naturalnej zdolności wydzielania enzymów oksydoredukcyjnych. Synteza związków przy użyciu biokatalizatorów grzybowych zachodzi *in situ* a dodatkowo unieruchomienie biomasy na nośniku pozwala na łatwe oddzielenie produktów od środowiska reakcji. Biokataliza przy udziale biomasy grzybowej poprzez eliminację chemicznych substancji utleniających stwarza podstawy do otrzymania produktów o zmniejszonej toksyczności.

Celem badań było zastosowanie unieruchomionej biomasy grzybowej do przekształceń prostych związków fenolowych w barwne produkty reakcji.

## Materiały i metody

### Unieruchamianie biomasy grzybowej

Homogenatem 14-dniowej hodowli grzybów *Cerrena unicolor* i *Fomes fomentarius* zaszczerpiono 50 ml pożywki hodowlanej PDA (*Potato Dextrose Broth, Sigma*) umieszczonej w 100-ml kolbach stożkowych. Grzybnię unieruchomiono na nośniku wykonanym z żyłki polipropylenowej o nieregularnym kształcie. Wytrząsane hodowle prowadzono w temp. 28°C przy 140 obr/min. Ponadto prowadzono hodowlę unieruchomionej biomasy *C. unicolor* w 2000-ml cylindrze szklanym zawierającym 1000-ml pożywki PDA. Hodowle w cylindrze napowietrzano za pomocą bulgotek szklanych (2 l/min).

### Transformacje substratów przez biomasę grzybową

Po 5–7 dniach obrastania nośnika przez biomasę grzybową płyn pohodowlany zdekantowano, a następnie dodano mieszaninę substratów zawieszonych w 5-krotnie rozcieńczonym jałowym podłożu PDA. Po 24-godzinnej transformacji prekursorów płyn pohodowlany zawierający produkt reakcji zlewano i dodawano świeżą porcję substratów w pożywce. Ilość powstałego produktu w czasie 24 godzin mierzono spektrofotometrycznie. W czasie hodowli monitorowano aktywność zewnątrzkomórkowej lakazy (wobec ABTS) w równoległych

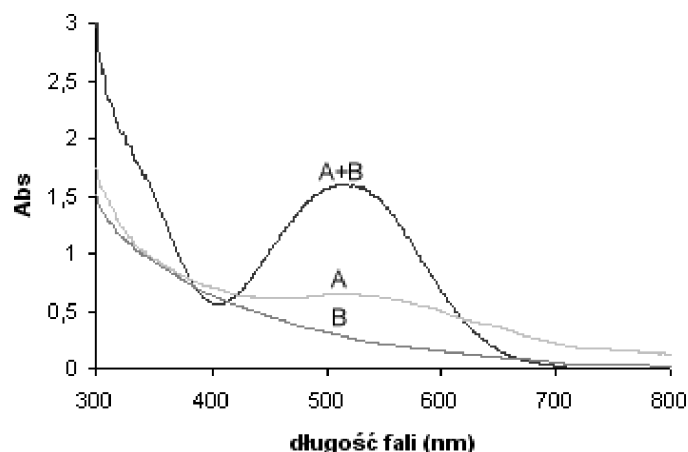
hodowlach prowadzonych bez dodatku substratów. Unieruchomione hodowle prowadzono 5 lub 4 tygodnie odpowiednio dla *C. unicolor* i *F. fomentarius*. W ciągu każdego tygodnia czterokrotnie powtarzano 24-godzinne transformacje nowych porcji prekursorów oraz trzydniowy okres regeneracji za pomocą podłoża bez dodatku prekursorów.

### Analizy chromatograficzne

Produkty transformacji analizowano z zastosowaniem chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC) na złożu krzemionkowym oraz elektrokinetycznej chromatografii micelarnej (MEKC).

## Wyniki i dyskusja

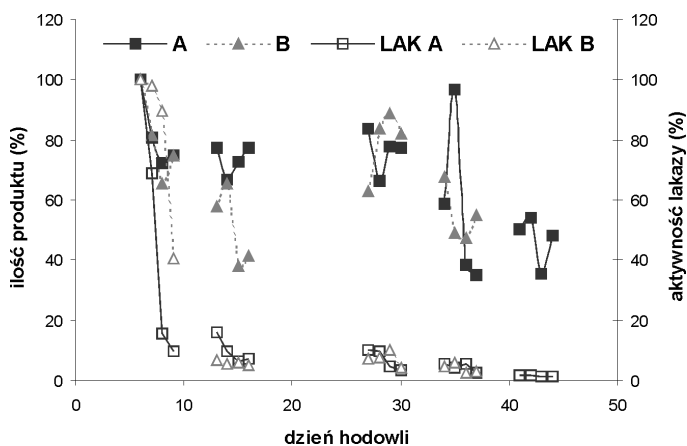
W wyniku działania biomasy grzybowej na pojedyncze substraty tj. kwas 4-metyloaminobenzoowy (A) oraz kwas 1,2-dihydroksybenzoowy (B) powstał nowy, barwny produkt (max 505–520 nm) tylko w przypadku zastosowania mieszaniny substratów (A+B) (Rys.1).



Rys. 1. Spektrum UV-Vis produktu powstałego w wyniku 24-godzinnej transformacji pojedynczych prekursorów (A, B) oraz ich mieszaniny (A+B) przez biomasę grzybową

Unieruchomiona biomasa grzybowa była stosowana jako biokatalizator reakcji w systemie intensywnych wymian substratów. Po 24-godzinnej transformacji mieszanina reakcyjna poddana była analizie spektrofotometrycznej oraz chromatografii cienkowarstwowej. Rys. 2 przedstawia zmiany w ilości syntetyzowanego produktu w czasie 5 i 4 tygodni intensywnych wymian odpowiednio dla *C. unicolor* i *F. fomentarius*. Ilość produktu porównano z aktywnością zewnątrzkomórkowej lakazy (LAK) w hodowlach kontrolnych prowadzonych bez dodatku prekursorów.

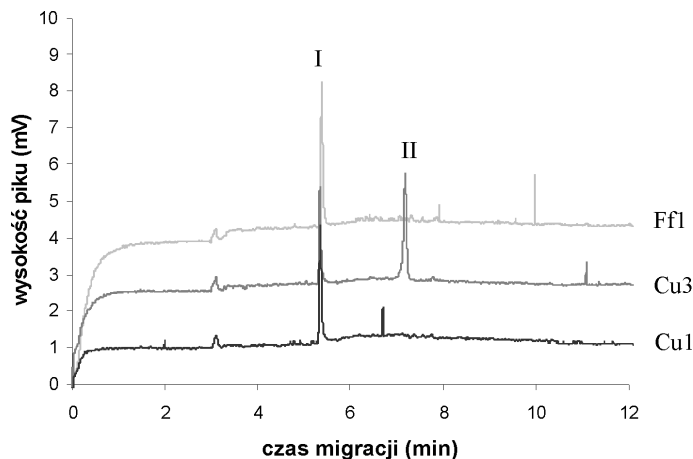
W pierwszym tygodniu intensywnych wymian odnotowano największą aktywność LAK zarówno w przypadku hodowli *C. unicolor* jak i *F. fomentarius* (odpowiednio 1800 U/l i 704 U/l) i zaobserwowano korelację pomiędzy aktywnością LAK a ilością powstałego produktu. Podczas kolejnych dni aktywność LAK systematycznie malała do poziomu 50–100 U/l, natomiast ilość powstałego produktu była nadal bardzo wysoka (Rys. 2).



Rys. 2. Zmiany ilości produktu powstałego w wyniku transformacji substratów przez biomasę grzybową *C. unicolor* (A) i *F. fomentarius* (B), w porównaniu z ilością zewnątrzkomórkowej lakazy w hodowlach kontrolnych *C. unicolor* (LAK A) i *F. fomentarius* (LAK B)

W przypadku transformacji przez biomasę *C. unicolor* jej wydajność kształtowała się na poziomie od 70 do 80% w czasie drugiego i trzeciego tygodnia intensywnych wymian w porównaniu z wydajnością wymian w pierwszym tygodniu (przyjęta za 100%). Wydajność transformacji przez biomasę *F. fomentarius* oscylowała w przedziale od 40 do 90% w kolejnych wymianach. Po okresie regeneracji między drugim a trzecim tygodniem wymian zanotowano wyższą efektywność procesu syntezy, która osiągnęła wartość 96%. Jednocześnie nie zanotowano wzrostu aktywności zewnątrzkomórkowej LAK, która w dalszym ciągu nie przekraczała 10% maksymalnej aktywności uzyskanej podczas trwania eksperymentu. Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że transformacja substratów może zachodzić nie tylko przy udziale zewnątrzkomórkowej lakazy, ale także przy udziale lakazy związanej z błonami komórkowymi (Rys. 2).

Analiza chromatograficzna HPTLC otrzymanego produktu wykazała jego homogenność tylko w przypadku transformacji przy udziale *F. fomentarius*. Produkt otrzymany w hodowlach *C. unicolor* był homogeny tylko w początkowym okresie hodowli (1 i 2 tydzień) natomiast produkt powstały w trzecim tygodniu był mieszaniną dwóch substancji. Wyniki otrzymane z analizy cienkowarstwowej zostały potwierdzone przez elektroforezę kapilarną MEKC. W mieszaninie poreakcyjnej powstałej w wyniku biotransformacji przy użyciu biomasy *C. unicolor* stwierdzono obecność dwóch produktów reakcji (I i II), które różniły się zarówno wielkością piku jak i czasem migracji, podczas gdy dla *F. fomentarius* stwierdzono obecność jedynie głównego produktu reakcji (I) (Rys. 3).



Rys. 3. Obraz chromatograficzny (MEKC) produktów reakcji powstałych w wyniku transformacji substratów przez biomasę *C. unicolor* w czasie pierwszego (Cu1) i trzeciego (Cu3) tygodnia intensywnych wymian oraz biomasę *F. fomentarius* (Ff1); główny produkt reakcji - I, dodatkowy produkt reakcji - II

W celu 20-krotnego zwiększenia skali transformacji substratów w kolejnym etapie badań transformację przeprowadzono w bioreaktorze (cylinder o pojemności 2000 ml), zawierającym unieruchomioną biomasę grzybową. Tablica 1 przedstawia ilość produktu powstałego w kolejnych wlewach substratów. Największą wydajność procesu ok. 70% odnotowano w pierwszym tygodniu transformacji, dla 1 mM stężenia substratów. Zastosowanie większego stężenia prekursorów w dalszych tygodniach eksperymentu skutkowało dużo niższą wydajnością syntezy od około 12 do 23% dla stężenia 5 mM i od 20 do 45% dla stężenia 2,5 mM.

Tablica 1  
Zmiany ilości produktu powstałego w kolejnych wlewach

Numer wlewu	Stężenie substratów [mM]	Abs $\lambda = 520 \text{ nm}$	% syntezy enzymatycznej*
I	1	4,2	56,2
II	1	4,5	59,4
III	1	4,5	60,7
IV	5	8,8	23,6
V	5	7,5	19,9
VI	5	4,5	11,9
VII	5	4,8	12,7
VIII	2,5	8,6	45,7
IX	2,5	6,9	36,7
X	2,5	5,6	30,1
XI	2,5	3,9	20,7

\* ilość produktu powstałego w hodowli grzybowej porównano do ilości otrzymanej z transformacji prowadzonej przez lakazę z *C. unicolor* wykonywanej dla analogicznego stężenia substratu.

## LITERATURA

1. F. Xu: Ind. Biotechnol., 1, 38, (2005).
2. L. Hoegh: PCT patent WO 2004091312-A1 (2004).