

Jolanta POLAK, Anna JAROSZ-WILKOŁAZKA

e-mail: jpolak@poczta.umcs.lublin.pl

Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

## Unieruchomiona biomasa grzybowa jako biokatalizator w syntezie barwników tekstylnych

### Wstęp

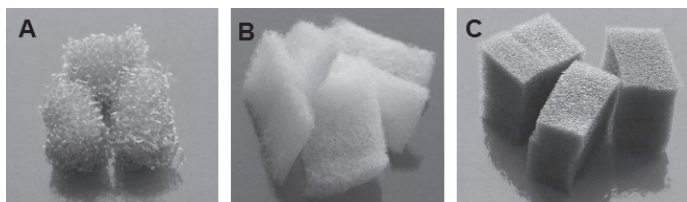
Nowoczesne metody biotechnologii przemysłowej wykorzystujące właściwości katalityczne organizmów lub ich komponentów np. enzymów, czynią te procesy bardziej przyjazne środowisku naturalnemu [Xu, 2005]. Wśród katalizatorów enzymatycznych szczególną rolę pełnią oksydoreduktazy wytwarzane przez grzyby należące do białej zgnilizny drewna. Do tej grupy enzymów należy lakaza, oksydoreduktaza o niskiej specyficzności substratowej, co powoduje, że enzym ten ma ogromny potencjał aplikacyjny w procesach biotransformacji [Mikolasch i Schauer, 2009]. W wyniku lakazowego utleniania prostych substratów fenolowych dochodzi do wytworzenia niestabilnej i bardzo reaktywnej formy rodnikowej substratu, która może ulegać reakcji sprzęgania z innymi substratami organicznymi. Taką właściwość wykazuje również biomasa grzybów ligninolitycznych, o naturalnej zdolności wydzielania lakazy. Biotransformacja związków przez grzyby zachodzi *in situ*, nie wymaga kosztownego i czasochłonnego procesu pozyskiwania i oczyszczania enzymu oraz angażuje dodatkowe układy enzymatyczne, które poprawiają wydajność procesu transformacji. Unieruchomienie biomasy na trwałym nośniku ogranicza swobodną migrację komórek i umożliwia działanie układu w systemie ciągłym. Nośnikami wykorzystywanymi w tej metodzie mogą być między innymi gąbka poliuretanowa oraz siatka wykonana z żyłki polipropylenowej lub stali nierdzewnej [Couto *in in.*, 2004]. Unieruchomione hodowle grzybów ligninolitycznych znalazły zastosowanie zarówno w degradacji jak i w syntezie barwników tekstylnych [Couto *in in.*, 2004; Polak i Jarosz-Wilkolazka, 2010].

W niniejszej pracy podsumowano badania dotyczące unieruchamiania biomasy grzybowej na trzech rodzajach nośników oraz jej zastosowaniu do transformacji prostych substratów organicznych w barwniki tekstylne.

### Materiały i metody

#### Unieruchamianie biomasy grzybowej

Cztery gatunki grzybów ligninolitycznych charakteryzujące się naturalną właściwością wydzielania lakazy (*Trametes versicolor* – TV7, *Fomes fomentarius* – FF25, *Abortiporus biennis* – AB123 i *Cerrena unicolor* – CU139) zostały unieruchomione na nośnikach o porowatej strukturze siatki lub gąbki. Siatka wykonana była z żyłki polipropylenowej (A) o średnicy oczka od 3 do 5 mm, natomiast jako gąbki użyto filtr celulozowy (B) oraz gąbkę poliuretanową (C) (Rys. 1).



Rys. 1. Rodzaje nośników stosowanych do unieruchomienia biomasy grzybowej: siatka polipropylenowa (A), filtr celulozowy (B) oraz gąbka poliuretanowa (C)

Nośniki umieszczono w szklanych kolbach stożkowych (250 ml) zawierających 100 ml pożywki glukozy-ziemniaczanej [4]. Całość sterylizowano, a następnie szczepiono homogenatem grzybni stanowiącym 3% całkowitej objętości płynu hodowlanego. Obrastanie nośnika przez grzybnie trwało od 5 do 7 dni w warunkach hodowli wytrząsanej

(140 obr/min), w temperaturze  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . W czasie 40-dniowej hodowli monitorowano zdolność grzybni do trwałego obrośnięcia nośnika oraz poziom lakazy zewnątrzkomórkowej. W 20. i 36. dniu hodowli podłoże hodowlane dekantowano i następnie dodawano świeżą porcję pożywki.

#### Synteza barwnika fenoksazyнового

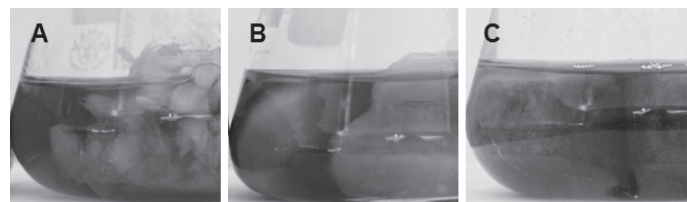
W ramach pracy przeprowadzono transformację kwasu 3-amino-4-hydroksybenzenosulfonowego (AHBS) przy zastosowaniu płynnych hodowli wytrząsanych, zawierających biomasa szczepów TV7, FF25, AB123 oraz CU139, unieruchomioną na siatce polipropylenowej lub filtrze celulozowym. Transformację AHBS przeprowadzono w trakcie trzech następujących po sobie 48-godzinnych wymian (wymiana I, II, III). Do siedmiodniowych hodowli, charakteryzujących się całkowitym unieruchomieniem biomasy, dodawano mieszaninę transformacyjną, którą stanowił roztwór substratu (1 mM) rozpuszczony w 10-krotnie rozcieńczonej pożywce glukozy-ziemniaczanej (wymiana I). Po 48 godzinach inkubacji płyn pohodowlany, który zawierał powstały produkt, dekantowano i dodawano kolejną porcję mieszaniny transformacyjnej (wymiana II). Pomiędzy II a III wymianą zastosowano przerwę regeneracyjną (R), polegającą na 24-godzinnej inkubacji grzybni w 10-krotnie rozcieńczonej pożywce bez dodatku substratu. Ilość produktu monitorowano przy długości fali 436 nm i wyrażono w jednostkach absorbancji w przeliczeniu na 1 gram suchej masy grzybni ( $\text{Abs}_{436/\text{g}}$ ).

#### Pomiar aktywności lakazy zewnątrzkomórkowej

Aktywność lakazy oznaczano spektrofotometrycznie z zastosowaniem soli dwuamonowej 2,2 bis-azy-no-bis(3-etylobenzo-tiazolino-6-kwasu sulfonowego) (ABTS) jako substratu; powstały produkt monitorowano przy długości fali 414 nm a aktywność enzymu wyrażano w jednostkach U w przeliczeniu na litr. Jeden U to taka ilość enzymu, która przekształca 1  $\mu\text{mol}$  ABTS do jego rodnika  $\text{ABTS}^+$  lub/i  $\text{ABTS}^{2+}$  w ciągu jednej minuty.

### Wyniki i dyskusja

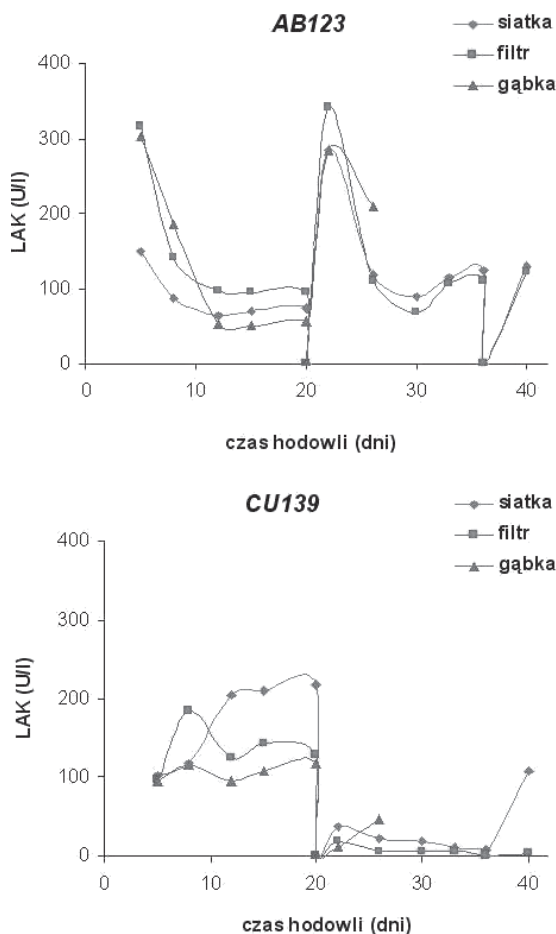
Wszystkie przebadane gatunki grzybów wykazały zdolność do obrastania testowanych nośników oraz wydzielania zewnątrzkomórkowej lakazy już w czasie pierwszych siedmiu dni hodowli. Najlepszy wzrost biomasy zaobserwowano na siatce polipropylenowej oraz na filtrze celulozowym i w tych wariantach nie zaobserwowano obecności wolnych fragmentów grzybni w płynie hodowlanym w czasie całej hodowli (Rys. 2).



Rys. 2. Zdjęcia grzybni unieruchomionej na siatce polipropylenowej (A), filtrze celulozowym (B) oraz gąbce poliuretanowej (C) w 4. dniu hodowli

Natomiast w przypadku zastosowania gąbki poliuretanowej zaobserwowano fragmenty grzybni nieobrastające nośnik i zawieszony w płynie hodowlanym. Podczas hodowli grzybowych monitorowano aktywność zewnątrzkomórkowej lakazy. Największe aktywności niespecyficzne lakazy (U/l) odnotowano dla hodowli AB123, unieruchomionych na

filtrze celulozowym lub gąbce poliuretanowej (Rys. 3). We wszystkich wariantach hodowlanych gatunków *TV7*, *FF25* oraz *CUI39* aktywność lakazy nie przekraczała wartości 300 U/l.



Rys. 3. Wpływ unieruchomienia biomasy grzybowej na aktywność niespecyficzną lakazy (U/l) w czasie 40-dniowej hodowli wytrząsanej *Abortiporus biennis* (*AB123*) i *Cerrena unicolor* (*CUI39*)

Hodowle kontrolne, czyli rosące bez dodatku nośników, wykazywały zdolność do wydzielania ponad 10-krotnie większej aktywności lakazy niż hodowle, w których biomasa była unieruchamiana na nośnikach.

Transformacje substratu AHBS przeprowadzono przy zastosowaniu płynnych hodowli wytrząsanych, zawierających biomasa grzybową szczepów *TV7*, *FF25*, *AB123* oraz *CUI39* unieruchomioną na nośnikach. Przy zastosowaniu metod spektrofotometrycznych monitorowano zarówno intensywność barwy powstałego produktu ( $Abs_{436nm}$ ) jak i aktywność lakazy w hodowlach kontrolnych bez dodatku substratu. Na podstawie uzyskanych wyników można jednoznacznie stwierdzić, iż gatunek grzyba ma duży wpływ na wydajność transformacji substratu AHBS w barwne produkty (Tab. 1). Największą ilość produktu w przeliczeniu na gram suchej masy grzybni zaobserwowano w trzech kolejnych wymianach w układzie zawierającym unieruchomioną biomasa *FF25* (Tab. 1). Najmniej produktu uzyskano w czasie wymiany I dla wariantu z biomasa *CUI39* unieruchomioną na filtrze celulozowym. Ponadto zaobserwowano, że absorbancja produktu powstałego w trakcie wymiany II była nieznacznie wyższa od absorbancji produktu, uzyskanego podczas transformacji zachodzącej w wymianach I i III, co mogło być związane z adsorpcją barwnika w przestrzeniach międzykomórkowych grzybni.

Równoległe prowadzono hodowle kontrolne bez dodatku substratu AHBS, w których monitorowano aktywność zewnątrz komórkowej lakazy. Maksymalną aktywność wydzielonej lakazy w hodowlach kontrolnych uzyskano dla układu zawierającego biomasa *AB123* unieruchomioną na filtrze celulozowym w wymianie I (Tab. 2).

Tab. 1. Wpływ zastosowanego gatunku grzyba na ilość produktu powstałego w wyniku transformacji substratu AHBS

Szczep	Nośnik	Ilość produktu ( $Abs_{436}/g$ )		
		wymiana I	wymiana II	wymiana III
<i>TV7</i>	siatka	25,1 ± 1,4	30,2 ± 0,7	21,2 ± 0,2
	filtr	22,9 ± 1,7	27,1 ± 2,2	22,5 ± 1,0
<i>FF25</i>	siatka	74,1 ± 8,4	76,7 ± 6,3	65,6 ± 6,9
	filtr	47,0 ± 9,6	60,5 ± 7,7	50,2 ± 11,9
<i>AB123</i>	siatka	24,9 ± 5,6	34,6 ± 8,1	31,4 ± 13,2
	filtr	19,1 ± 7,5	25,9 ± 10,7	22,0 ± 6,8
<i>CUI39</i>	siatka	24,7 ± 19,1	38,4 ± 0,3	38,1 ± 1,3
	filtr	5,3 ± 3,8	36,4 ± 3,7	40,0 ± 4,5

Tab. 2. Maksymalna aktywność lakazy (U/l) uzyskana w hodowlach unieruchomionych grzybów (*TV7*, *FF25*, *AB123*, *CUI39*), R – regeneracja hodowli, (24) – czas inkubacji [h], podczas którego uzyskano maksymalną aktywność enzymu

Grzyb	Nośnik	Maksymalna aktywność lakazy (U/l)			
		wymiana I	wymiana II	R	wymiana III
<i>TV7</i>	siatka	47 ± 15 (24)	34 ± 5 (48)	40 ± 3	61 ± 24 (24)
	filtr	110 ± 7 (24)	70 ± 7 (24)	47 ± 12	52 ± 4 (24)
<i>FF25</i>	siatka	46 ± 32 (24)	66 ± 40 (48)	49 ± 18	54 ± 9 (24)
	filtr	65 ± 21 (24)	35 ± 18 (24)	11 ± 20	42 ± 15 (48)
<i>AB123</i>	siatka	47 ± 12 (24)	59 ± 27 (48)	60 ± 52	31 ± 27 (48)
	filtr	159 ± 1 (24)	58 ± 36 (48)	36 ± 12	16 ± 14 (24)
<i>CUI39</i>	siatka	94 ± 11 (48)	63 ± 12 (48)	33 ± 12	48 ± 18 (48)
	filtr	94 ± 33 (48)	94 ± 2 (48)	46 ± 11	53 ± 1 (24)

Minimalnie większe aktywności uzyskano w hodowlach z biomasa unieruchomioną na filtrze celulozowym szczególnie w czasie wymiany I. Nie miało to większego znaczenia dla syntezy barwnika, albowiem największe jego ilości uzyskane zostały w hodowlach z zastosowaniem siatki polipropylenowej jako nośnika.

## Wnioski

Biomasa wszystkich przebadanych grzybów ligninolitycznych wykazała zdolność do obrabiania testowanych nośników.

Najlepsze rezultaty osiągnięto w przypadku zastosowania siatki polipropylenowej, która charakteryzowała się porowatą strukturą umożliwiającą adhezję grzybni, dobry wzrost podczas hodowli wytrząsanych i bardzo dobrą aktywność enzymatyczną i biotransformacyjną.

Biomasa unieruchomiona na nośnikach zdolna była do transformacji prostych związków fenolowych w produkty barwne bez konieczności pozyskiwania i oczyszczania biokatalizatora enzymatycznego.

Proces transformacji substratu w barwnik zachodzi *in situ* z wydajnością porównywalną do procesu z użyciem wyizolowanego enzymu, pomimo niskich aktywności lakazy zewnątrzkomórkowej obserwowanych w płynie hodowlanym hodowli grzybowych. Może się to wiązać z zaangażowaniem dodatkowych układów enzymatycznych i kofaktorów, które usprawniają proces przenoszenia elektronów z substratu na tlen cząsteczkowy i zwiększają proces biotransformacji bezbarwnego substratu AHBS w barwnik fenokszynowy.

## LITERATURA

- Xu F., 2005. Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Ind. Biotechnol.* 1, nr 1, 38-50. DOI:10.1089/ind.2005.1.38.
- Mikolasch A., Schauer F., 2009. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, nr 4, 605-624. DOI: 10.1007/s00253-009-1869-z.
- Couto S.R., Sanromán M.A., Hofer D., Gübitz G.M., 2004. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolorisation of textile dyes. *Bioresource Technol.*, 95, nr 1, 67-72. DOI: 10.1016/j.biortech.2003.05.002
- Polak J., Jarosz-Wilkołazka A., 2010. Whole-cell fungal transformation of precursors into dyes. *Microb. Cell Fact.* 9, 51-59. DOI: 10.1186/1475-2859-9-51.