

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXII, 16

SECTIO C

1977

Instytut Chemii i Technologii Rolnej AR w Lublinie  
Zakład Technologii Rolnej

Ewa KISIELEWSKA, Stanisław BUJAK

**Wpływ warunków hodowli na aktywność ksylanolityczną  
grzybów niższych**

Влияние условий культивирования на ксиланолитическую активность низших грибов

The Effect of Culture Conditions on Xylanase Activity of Lower Fungi

WSTĘP

Aktywność drobnoustrojów w biosyntezie określonych produktów uzależniona jest od warunków ich hodowli. Wśród tych warunków do szczególnie ważnych należy zaliczyć metodę hodowli (powierzchniową lub wgłębną). Obecnie w warunkach przemysłowych coraz częściej prowadzi się hodowlę wgłębną, skracając czas hodowli i zapewniając lepszą kontrolę procesu (9, 11, 12).

Niepośledni wpływ na biosyntezę określonych połączeń ma rodzaj źródeł pożywienia azotowego i węglowego. Z licznych badań wynika, że nie tylko rodzaj, ale i stężenie źródła azotu wpływa na wydajność biosyntezy enzymów przez drobnoustroje (1, 4, 5, 16).

W biosyntezie enzymów celulolitycznych i ksylanolitycznych stosowane są odpady rolnicze lub przemysłu drzewnego. Głównym źródłem węgla, użytym w doświadczeniach, była zmielona słoma. Jest to surowiec dostępny i bogaty zarówno w celulozę, jak i hemicelulozy, zatem winien być przydatny do biosyntezy enzymów ksylanolitycznych.

Celem było porównanie szybkości nagromadzania się enzymów ksylanolitycznych w hodowlach stacjonarnych i wgłębnych oraz przebadanie wpływu różnych źródeł azotu i dodatkowych źródeł węgla na aktywność niektórych szczepów grzybów niższych w biosyntezie ksylanaz.

## METODY

W celu porównania szybkości nagromadzania się enzymów w hodowlach stacjonarnych i wytrząsanych szczepiono 150 ml pożywki Saundersa (13) z dodatkiem 2% sproszkowanej słomy konidiami badanych grzybów w ilości  $5 \times 10^7$  i hodowano przez 12 dni, sprawdzając co drugi dzień aktywność płynów pochodzących z hodowli stacjonarnych i wytrząsanych.

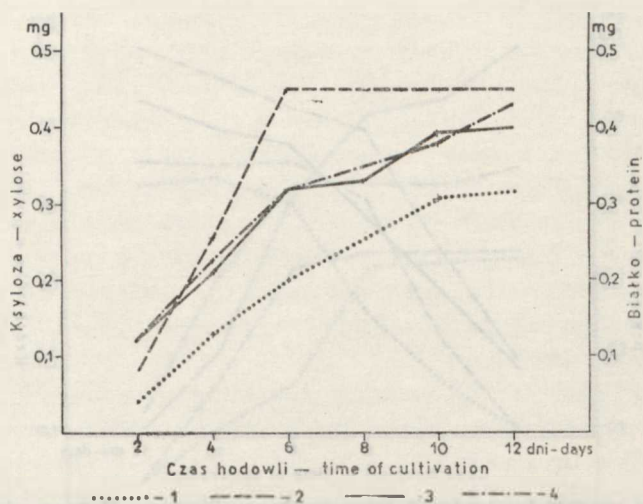
W doświadczeniu mającym na celu poszukiwanie optymalnych źródeł pożywienia azotowego dla użytych szczepów grzybów w biosyntezie ksylanaz badano przydatność  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ . Do podłoża hodowlanych poszczególnych kombinacji dodawano wymienione związki w takich ilościach, aby zawierały azotu w g/l: 0,66, 0,84, 0,98, 1,15, a więc poniżej i powyżej zawartości tego składnika w podłożu Saundersa (0,84 g N/l w postaci  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  i  $\text{NaNO}_3$ ). Hodowle prowadzono na wytrząsarce (względnie) przez 8 dni. Za kontrolę służyła hodowla na pełnej pożywce Saundersa. Po zakończeniu hodowli płyny pochodzące oddzielano od grzybni i oznaczano ich aktywność ksylanolityczną.

W celu przebadania wpływu niektórych dodatkowych źródeł węgla w podłożu na aktywność szczepów w biosyntezie ksylanaz dodawano do pożywki Saundersa, zawierającej 2% sproszkowanej słomy, po 0,5, 1,0 lub 2,0% ksylozy, laktozy lub skrobi rozpuszczalnej. Hodowle prowadzono na wytrząsarce przez 8 dni w temp. 28°C. Kontrolę stanowiły hodowle na podłożu Saundersa bez dodatkowych źródeł węgla.

Aktywność ksylanolityczną oznaczano kolorymetrycznie metodą Samogyi-Nelsona wg Gjertsen (2). Mieszanina reagująca zawierała 1 ml 1% koloidalnego roztworu ksylanu, 1,3 ml buforu octanowego o pH 5,5, 1,0 ml płynu pochodzącego, 1,7 ml wody i 3 krople toluenu. Po zakończonej hydrolizie oznaczono w mieszaninie reagującej ilość wytworzonych substancji redukujących. Odczytane wyniki ekstynkcji przy długości fali 520 nm przeliczano na 1 mg ksylozy przy pomocy krzywej standardowej. Aktywność ksylanolityczną wyrażano w miligramach cukrów redukujących wytworzonych przez 1 ml płynu pochodzącego w ciągu 1 godz. oraz w przeliczeniu na 1 mg białka zawartego w przesączu hodowlanym. Białko oznaczano metodą Lowry (8).

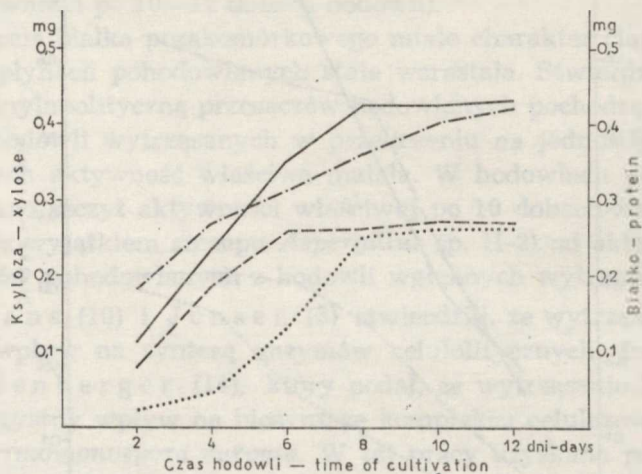
## WYNIKI I DYSKUSJA

Wyniki dotyczące wpływu metody prowadzenia hodowli na aktywność biosyntezy ksylanaz przez badane szczepy grzybów podano na ryc. 1—5. Stwierdzono dość istotne różnice w aktywności enzymatycznej płynów pochodzących wszystkich przebadanych szczepów w zależności od czasu trwania i warunków hodowli. Płyny pochodzące z hodowli badanych szczepów otrzymane z hodowli wytrząsanych wykazywały aktywność ksylanazową w granicach 0,25—0,45 mg ksylozy/ml/godz. po 6 dniach hodowli. Natomiast aktywność płynów pochodzących z hodowli tych samych szczepów, lecz prowadzonych metodą powierzchniową, wahała się w granicach 0,10—0,20 mg ksylozy/ml/godz. Największy przyrost aktywności ksylanaz zaobserwowano w hodowlach wytrząsanych między czwartą a szóstą dobą hodowli. Po 8, 10, 12 dobach hodowli aktywność płynów pochodzących utrzymywała się na tym samym poziomie. W hodowlach powierzchniowych



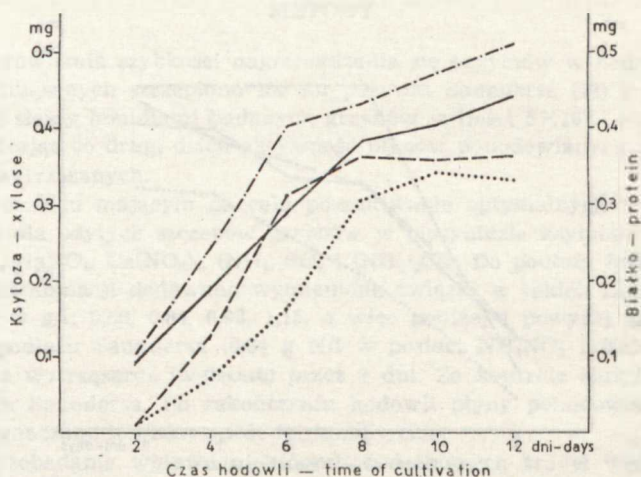
Ryc. 1. Wpływ warunków hodowli szczepu *Aspergillus ventii* 13/15 na aktywność ksylanolityczną i ilość białka w płynach pohodowlanych; 1, 2 — cukry redukujące (mg/ml/godz.), 3, 4 — białko mg/ml, 1, 3 — hodowle stacjonarne, 2, 4 — hodowle wytrząsane

Effects of the culture conditions on the xylanase activity and amount of protein in culture filtrates of *Aspergillus ventii* 13/15; 1, 2 — reducing sugars (mg/ml/hr), 3, 4 — protein mg/ml, 1, 3 — static cultures, 2, 4 — shaken cultures

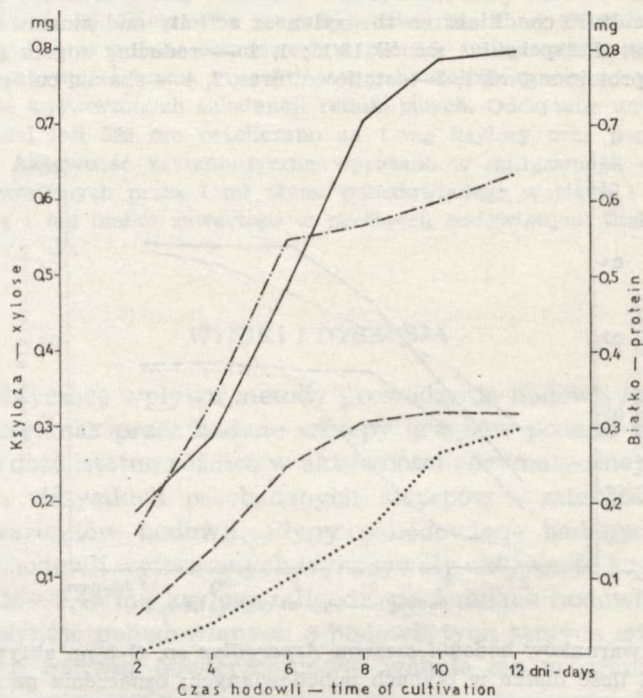


Ryc. 2. Wpływ warunków hodowli szczepu *Aspergillus* sp. G-5 na aktywność ksylanolityczną i ilość białka w płynach pohodowlanych; oznaczenia patrz ryc. 1

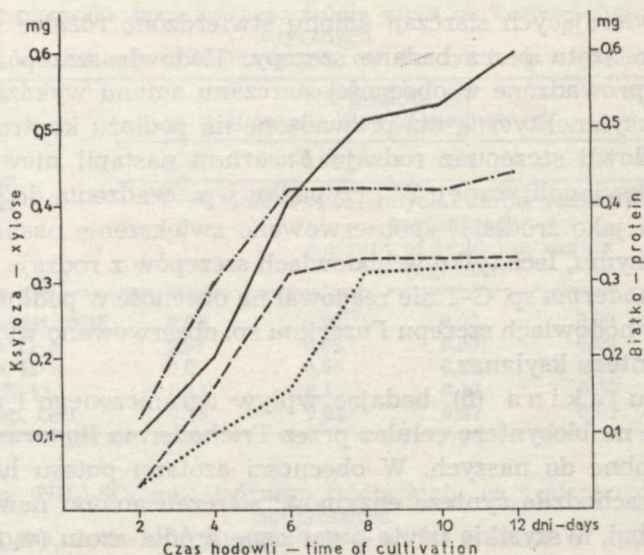
Effect of the culture conditions on the xylanase activity and amount of protein in culture filtrates of *Aspergillus* sp. G-5; footnote Fig. 1



Ryc. 3. Wpływ warunków hodowli szczepu *Aspergillus* sp. H-2 na aktywność ksyłanolityczną i ilość białka w płynach pochodowlanych; oznaczenia patrz ryc. 1  
Effect of the culture conditions on the xylanase activity and amount of protein in culture filtrates of *Aspergillus* sp. H-2; footnote Fig. 1



Ryc. 4. Wpływ warunków hodowli szczepu *Fusarium* sp. E-15 na aktywność ksyłanolityczną i ilość białka w płynach pochodowlanych; oznaczenia patrz ryc. 1  
Effect of the culture conditions on the xylanase activity and amount of protein in culture filtrates of *Fusarium* sp. E-15; footnote Fig. 1



Ryc. 5. Wpływ warunków hodowli szczepu *Trichoderma* sp. G-1 na aktywność ksylanolityczną i ilość białka w płynach pohodowlanych; oznaczenia patrz ryc. 1  
Effect of the culture conditions on the xylanase activity and amount of protein in culture filtrates of *Trichoderma* sp. G-1; footnote Fig. 1

wzrost aktywności ksylanazowej był wolniejszy i bardziej równomierny (szczyt aktywności po 10—12 dobach hodowli).

Wydzielanie białka pozakomórkowego miało charakter ciągły, jego zawartość w płynach pohodowlanych stale wzrastała. Stwierdzono wyższą aktywność ksylanolityczną przesączów hodowlanych pochodzących z 6—8-dobowych hodowli wytrząsanych w przeliczeniu na jednostkę białka. Po 10—12 dobach aktywność właściwa malała. W hodowlach powierzchniowych osiągnęto szczyt aktywności właściwej po 10 dobach hodowli i była ona niższa (z wyjątkiem szczepu *Aspergillus* sp. H-2) od aktywności właściwej płynów pohodowlanych z hodowli wgłębnych wytrząsanych.

Norkrans (10) i Jensen (3) stwierdzili, że wytrząsanie ma niekorzystny wpływ na syntezę enzymów celulozowych. Innego zdania był Stutzenberger (14), który podał, że wytrząsanie hodowli wywierało korzystny wpływ na biosyntezę kompleksu celulozowego promieniowca *Thermomonospora curvata*. W tej pracy uzyskano przyspieszenie syntezy enzymów ksylanolitycznych u wszystkich badanych szczepów.

Wpływ różnych źródeł azotu na aktywność ksylanolityczną badanych szczepów przedstawiono w tab. 1—5. Wyniki podane w tabelach stanowią średnią z trzech powtórzeń. Niekorzystnym źródłem azotu okazały się  $KNO_3$  i mocznik. Związki te hamowały biosyntezę badanych enzymów i to niezależnie od stężenia tego połączenia i rodzaju badanego szczepu. W ho-

dowlach zawierających siarczan amonu stwierdzono różnice w reakcjach na to źródło azotu przez badane szczepy. Hodowle szczepów z rodzaju *Aspergillus* prowadzone w obecności siarczanu amonu wykazały mniejszą aktywność ksylanolityczną niż prowadzone na podłożu kontrolnym, natomiast w hodowli szczepu z rodzaju *Fusarium* nastąpił niewielki wzrost aktywności ksylanolitycznej. W przypadku wprowadzenia do podłoża azotanu wapnia jako źródła N zaobserwowano zwiększenie nasilenia biosyntezy tego enzymu, lecz tylko w hodowlach szczepów z rodzaju *Aspergillus*. Szczep *Trichoderma* sp. G-1 nie reagował na obecność w podłożu Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, natomiast w hodowlach szczepu *Fusarium* sp. obserwowano wyraźne hamowanie biosyntezy ksylanaz.

Kozie m jakina (6) badając wpływ ograniczonego i mineralnego źródła azotu na biosyntezę celulaz przez *Trichoderma lignorum* otrzymała wyniki podobne do naszych. W obecności azotanu potasu lub siarczanu amonu nie zachodziła synteza enzymów; siarczan amonu nawet hamował wzrost grzybni. Wszystkie użyte organiczne źródła azotu (w tym i mocz-

Tab. 1. Wpływ NaNO<sub>3</sub> jako jedynego źródła azotu na biosyntezę enzymów ksylanolitycznych  
Effect of NaNO<sub>3</sub> as the only nitrogen source on the biosynthesis of xylanase enzymes

Szczep Strain	N/l podłoża (g)				Pożywka kontrolna Control medium
	N in one litre of medium (g)				
	0,66	0,84	0,98	1,15	
	Ilość wytworzonych cukrów redukujących mg/ml/godz. Amount of reducing sugars mg/ml/hr				
<i>Aspergillus wentii</i> 13/15	0,42	0,45	0,46	0,46	0,47
<i>Aspergillus</i> sp. G-5	0,29	0,29	0,31	0,31	0,32
<i>Aspergillus</i> sp. H-2	0,34	0,35	0,36	0,37	0,36
<i>Fusarium</i> sp. E-15	0,29	0,31	0,33	0,34	0,32
<i>Trichoderma</i> sp. G-1	0,25	0,27	0,29	0,31	0,29

Tab. 2. Wpływ KNO<sub>3</sub> jako jedynego źródła azotu na syntezę enzymów ksylanolitycznych  
Effect of KNO<sub>3</sub> as the only nitrogen source on the synthesis of xylanase enzymes

Szczep Strain	N/l podłoża (g)				Pożywka kontrolna Control medium
	N in one litre of medium (g)				
	0,66	0,84	0,98	1,15	
	Ilość wytworzonych cukrów redukujących mg/ml/godz. Amount of reducing sugars mg/ml/hr				
<i>Aspergillus wentii</i> 13/15	0,11	0,15	0,10	0,10	0,48
<i>Aspergillus</i> sp. G-5	0,16	0,10	0,15	0,12	0,30
<i>Aspergillus</i> sp. H-2	0,12	0,12	0,11	0,11	0,35
<i>Fusarium</i> sp. E-15	0,15	0,15	0,12	0,11	0,33
<i>Trichoderma</i> sp. G-1	0,06	0,09	0,05	0,05	0,34

Tab. 3. Wpływ mocznika jako jedynego źródła azotu na syntezę enzymów ksylianolitycznych  
Effect of urea as the only nitrogen source on the synthesis of xylanase enzymes

Szczep Strain	N/l podłoża (g) N in one litre of medium (g)				Pożywka kontrolna Control medium
	0,66	0,84	0,98	1,15	
	Ilość wytworzonych cukrów redukujących mg/ml/godz. Amount of reducing sugars mg/ml/hr				
<i>Aspergillus wentii</i> 13/15	0,06	0,05	0,00	0,00	0,47
<i>Aspergillus</i> sp. G-5	0,01	0,08	0,00	0,00	0,29
<i>Aspergillus</i> sp. H-2	0,07	0,06	0,00	0,00	0,36
<i>Fusarium</i> sp. E-15	0,13	0,13	0,12	0,10	0,31
<i>Trichoderma</i> sp. G-1	0,10	0,09	0,07	0,07	0,34

Tab. 4. Wpływ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  jako jedynego źródła azotu na syntezę enzymów ksylianolitycznych  
Effect of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  as the only nitrogen source on the synthesis of xylanase enzymes

Szczep Strain	N/l podłoża (g) N in one litre of medium (g)				Pożywka kontrolna Control medium
	0,66	0,84	0,98	1,15	
	Ilość wytworzonych cukrów redukujących mg/ml/godz. Amount of reducing sugars mg/ml/hr				
<i>Aspergillus wentii</i> 13/15	0,36	0,35	0,30	0,31	0,47
<i>Aspergillus</i> sp. G-5	0,21	0,23	0,18	0,15	0,28
<i>Aspergillus</i> sp. H-2	0,25	0,31	0,30	0,28	0,37
<i>Fusarium</i> sp. E-15	0,37	0,36	0,34	0,31	0,34
<i>Trichoderma</i> sp. G-1	0,28	0,29	0,29	0,30	0,30

Tab. 5. Wpływ  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  jako jedynego źródła azotu na syntezę enzymów ksylianolitycznych  
Effect of  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  as the only nitrogen source on the synthesis of xylanase enzymes

Szczep Strain	N/l podłoża (g) N in one litre of medium (g)				Pożywka kontrolna Control medium
	0,66	0,84	0,98	1,15	
	Ilość wytworzonych cukrów redukujących mg/ml/godz. Amount of reducing sugars mg/ml/hr				
<i>Aspergillus wentii</i> 13/15	0,46	0,48	0,52	0,58	0,47
<i>Aspergillus</i> sp. G-5	0,28	0,29	0,32	0,34	0,30
<i>Aspergillus</i> sp. H-2	0,33	0,34	0,36	0,38	0,34
<i>Fusarium</i> sp. E-15	0,20	0,19	0,20	0,15	0,32
<i>Trichoderma</i> sp. G-1	0,30	0,32	0,32	0,32	0,33

wytwarza więcej enzymów ksylanolitycznych na podłożu, w którym jedynym źródłem węgla są trociny (ok. 100 jedn. aktyw.) niż na podłożu zawierającym ksylan (ok. 3 jedn. aktyw.). Autorzy podają, że ksyloza powstająca w wyniku rozkładu ksylanu hamuje wytwarzanie ksylanazy. Jest to wynikiem sprzężenia zwrotnego.

## PIŚMIENNICTWO

1. Feniksowa R. W., Ulezło I. W.: Izuczenije biosintieza cellulazy *Myrothecium verrucaria*. Prikl. Bioch. Microb. **1** (4), 406 (1965).
2. Gjertsen P.: Carbohydrates Composition of Wort and Beer. J. Inst. Brew. **59**, 296 (1953).
3. Jensen K. T.: Cellulolytic Activity of *Stereum gausapatum*. Phytoph. **61**, 134 (1971).
4. Kawaminami T., Iizuka H.: Studies on Xylanase from Microorganisms. Part III. Production of Xylanase by *Streptomyces xylanophagus* nov. sp. Agr. Biol. Chem. **33** (12), 1787 (1969).
5. Kislicyna W. P., Kozłow K. A.: Wlijanije razlicznych istocznikov azotno-go i uglerodnogo pitanija na nakoplenije aktywnych cellulaz kulturami mikro-organizmow wydzielonych iz poczw wostocznoj Sibiri. Priklad. Bioch. Microb. **4** (1), 97 (1968).
6. Koziemjakina O. P., Łosjakowa L. S., Feniksowa R. W.: Biosin- tiez cellulazy pri kultiwirowaniju griba *Trichoderma lignorum* 6 G na twiordych sriedach. Fierm. Spirt. Promysz. **6**, 13 (1974).
7. Kubačková M., Karácsonyi S., Váradi J.: Studies on Xylanase from *Basidiomycetes*. Selection of Strains for the Production of Xylanase. Folia Mi- crobiol. **20**, 29 (1975).
8. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).
9. Mordarski M.: Drobnoustroje jako źródło enzymów do celów przemysło- wych. Postępy Mikrobiol. **10** (2), 417 (1971).
10. Norkrans B.: Influence of some Cultural Conditions on Fungal Cellulase Production. Physiol. Plant. **16**, 11 (1963).
11. Novo Enzyme Information.: Hemicellulase Novo- an Experimental Preparation. 1971.
12. Prescott S. C., Dunn C. G.: Industrial Microbiology. Mc Graw Hill Book Company Inc. New York 1959, 666.
13. Saunders P. R., Siu R. G. H., Genest R. N.: A Cellulolytic Preparation from *Myrothecium verrucaria*. J. Biol. Chem. **174**, 697 (1948).
14. Stutzenberger F. J.: Cellulolytic Activity of *Termomonospora curvata*. Optimal Assay Condition, Partial Purification and Products of the Cellulase, Appl. Microbiol. **24** (1), 83 (1972).
15. Sumizu K., Masaka Y., Tanaka S.: Studies on Xylanase of *Piricularia oryzae*. J. Bioch. (Tokyo) **50** (6), 538 (1961).
16. Zeltin R. P.: Wlijanije pitatielnoj sriedy na biosintiez celluloliticzeskich fier- mientow tiermotolerantnogo griba *Aspergillus terreus*. Mikrobiol. **39** (3), 574 (1970).



## РЕЗЮМЕ

Исследовалось влияние метода культивирования, разных источников азота и дополнительного источника углерода на ксиланолитическую активность 5 штаммов низших грибов. Благоприятные условия для образования внеклеточных ксиланолитических энзимов создавали глубинные культуры — происходило ускорение синтеза этих энзимов.

Неблагоприятное влияние на биосинтез ксиланаз у всех исследованных штаммов, независимо от их систематической принадлежности, оказывали такие источники азота как мочевины и нитрат калия. Влияние других источников азота зависело от рода штамма.

Добавление 0,5% лактозы усиливало синтез ксиланолитического энзима у штаммов рода *Aspergillus*. Добавление лактозы, ксилозы и растворимого крахмала в больших количествах (1,0 и 2%) на синтез ксиланаз этими штаммами низших грибов влияют отрицательно.

## SUMMARY

The effect of method of cultivation, different sources of nitrogen and additional source of carbon on xylanase activity of five strains of fungi were investigated. The correlation between xylanase activity of the examined strains and method of cultivation was found. Favourable conditions for the production of extracellular xylanase enzymes were created by incubation with shaking, cultivations under submerged conditions; the synthesis of these enzymes was accelerated.

Urea and potassium nitrate, as the sources of nitrogen, had a negative effect on the biosynthesis of xylanase in all the examined strains. The effect of other sources of nitrogen depended on the genus of examined strain.

The addition of lactose in 0.5% increased the intensity of synthesis of xylanase enzymes in the strain of *Aspergillus* genus. The addition of a larger quantity (1.0 and 2.0%) of lactose, xylose and soluble starch negatively affected xylanase activity by the examined strains of lower fungi.

