

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXVI, 6

SECTIO C

1971

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS
Zakład Mikrobiologii Stosowanej
Instytut Chemii i Technologii Rolnej WSR w Lublinie

Izabela SZAJER, Czesław SZAJER
Sergiusz KURENKO

**Wpływ aminokwasów siarkowych oraz hydrochinonu i pirokatecholu
na syntezę i aktywność enzymów celulolitycznych**

Влияние серных аминокислот, гидрохинона и пирокатехола на синтез
и активность целлюлолитических энзимов

Effect of Sulphur-containing-Amino Acids, Hydroquinone and Pyrocatechol on
the Synthesis and Activity of Cellulolytic Enzymes

Biosynteza enzymów ekstracelularnych u grzybów, indukowana przez substrat, może być stymulowana przez inne związki, jak np. węglowodany i organiczne połączenia azotu. Większość badaczy donosi o stymulującym działaniu wyłącznie niskich stężeń węglowodanów lub ich pochodnych. Davies (3) stwierdza dodatni wpływ rafinozy i glukozy na produkcję drożdżowej inwertazy. Mandels i Reese (11, 13) opisują analogiczne działanie laktozy i celobiozy, a Horton i Keen (7) — glukozy na syntezę enzymów celulolitycznych u *Trichoderma viride* i *Pyrenochaeta terrestris*. Ci sami autorzy (8) donoszą o zwiększonej aktywności pektolitycznej badanego szczepu w obecności glukozy i kilku innych heksoz. Z pochodnych węglowodanowych monopalmitynian sacharozy stymuluje biosyntezę inwertazy (18), a mono- i dwupalmitynian izomaltozy — produkcję dekstranazy u szczepów z rodzaju *Penicillium* (19); natomiast pochodna glukozy — soforoza efektywnie oddziałuje na biosyntezę celulazy u *Tr. viride* (12, 14).

Niektórzy badacze wskazują na znaczenie organicznych połączeń azotu w procesie biosyntezy grzybowych enzymów ekstracelularnych. Ashour (1) stwierdza wzrost aktywności pektolitycznej u *Botritis cinerea* w obecności wzrastających stężeń asparaginy, natomiast Norkrans

i Hammarström (16) podkreślają dodatni wpływ hydrolizatu kazeiny, tryptofanu i mieszaniny aminokwasów na biosyntezę celulazy u *Rhizina undulata*.

W odniesieniu do enzymów celulolitycznych interesującą grupę połączeń stanowią związki aktywujące te enzymy. Jak wynika z prac Basu i Whitakera (2), Sisona, Schuberta i Norda (20) oraz Eriksona i Peterssona (5), aminokwasy siarkowe, glutation oraz hydrochinon i pirokatechol reaktywują zainaktywowane solami rtęci enzymy celulolityczne u różnych rodzajów grzybów. Działanie to prawdopodobnie polega na wiązaniu soli rtęci i w konsekwencji na uwolnieniu od nich tiolowych grup enzymu, a grupy te — zdaniem autorów — stanowią centrum aktywności enzymów celulolitycznych. Eriksson (4) w badaniach nad strukturą enzymów celulolitycznych *Penicillium notatum* również podkreśla znaczenie mostków dwusiarczkowych, warunkujących stabilność enzymu, a poza tym wskazuje na istotne znaczenie aminokwasów aromatycznych, a ściślej — wolnych grup tryptofylowych w cząsteczce enzymu. Przytoczone fakty sugerują, że w poznaniu mechanizmów biosyntezy i aktywności enzymów celulolitycznych mogą okazać się pomocne badania nad związkami stymulującymi te procesy.

Celem pracy było przebadanie wpływu cystyny, cysteiny i metioniny oraz hydrochinonu i pirokatecholu na syntezę i aktywność enzymów celulolitycznych u wybranych szczepów grzybów.

MATERIAŁ I METODY

Przebadano następujące szczepy: *Myrothecium verrucaria* 12/1, *Trichoderma lignorum* 18/1, *Tr. viride* 18/4, *Penicillium lanosum* A/101, *P. purpurogenum* 1/18, *P. waksmani* A/45 oraz *Aspergillus oryzae* 13/5.

Szczepy przechowywano na agarowej pożywce Czapeka. Pożywkę podstawową stanowiła mineralna pożywka Czapeka z celulozą rozdrobnioną w mikserze do konsystencji zawiesiny (1—2%), wzbogacona śladową ilością glukozy (0,0075%) i peptonem (0,1%). Pożywkę rozlewano po 25 ml do kolb Erlenmeyera o pojemności 100 ml i sterylizowano w $\frac{3}{4}$ atm. przez 30 min.

Inoculum stanowiły krążki (\varnothing 2 cm) 7-dniowej grzybni z agarowej pożywki Czapeka.

Badane związki: cystynę, cysteinę, metioninę oraz hydrochinon i pirokatechol dodawano do pożywki podstawowej Czapeka w stężeniu 10^{-3} M przed sterylizacją lub do odwirowanych płynów pohodowlanych po zakończeniu inkubacji.

Hodowle statyczne grzybów prowadzono przez 14 i 28 dni, hodowle nawietrzano na wytrząsarce przez 6 dni w temp. 27°C, po czym wykonywano następujące oznaczenia:

1. Przyrost biomasy grzybni i ubytek celulozy w pożywce hodowlanej. Po odsączeniu płynu pohodowlanego przez tkaninę nylonową grzybnię z nie rozłożoną celulożą suszono w temp. 80°C przez 2 godz.

i ok. 1 godz. w temp. 105°C, aż do uzyskania stałej wagi i określonej suchej masy. Po zważeniu wysuszoną grzybnię z celulozą gotowano w 100 ml 0,1 n NaOH przez 30 min., sączono jak poprzednio, przemywano wodą dest. i ponownie gotowano w 100 ml 0,1 n HCl przez następne 30 min. Po ostudzeniu całość sączono, przepłukiwano wodą dest., po czym suszono jak wyżej. Czynności te miały na celu zhydrolizowanie grzybni i oznaczenie suchej masy celulozy pozostającej w pożywce. Znając wyjściową ilość celulozy w pożywce, obliczano procentowy ubytek celulozy podczas hodowli. Z różnicy ciężaru grzybni z celulożą i ciężaru samej celulozy obliczano przyrost biomasy grzybni w mg%.

2. Aktywność celulolityczna płynów pochodowlanych. Płyny pochodowlane, otrzymane po przesączeniu hodowli, wirowano, a następnie oznaczano ich aktywności enzymatyczne metodą Halliwella (6), posługując się schematem (tab. 1).

Tabela 1

Mieszanina reagująca Reaction mixture	Probówki — Samples		
	a	b	c
"Swollen cellulose" *	1 ml	1 ml	—
Bufor octanowy o pH 5,5 Sodium acetate buffer of pH 5.5	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
Enzym (płyn pochodowlany) Enzyme (culture fluid)	1 ml	—	1 ml
Badany związek chemiczny ** The examined compound **	x ml	—	x ml
Woda destylowana do objętości Water distilled to volume	5 ml	5 ml	5 ml

* "Swollen cellulose" — półkoloidalna, napęczniała postać celulozy.

** Badane związki chemiczne dodawano do probówek a i c w takich ilościach, aby w mieszaninie występowały w stężeniu $10^{-3}M$.

** The examined chemical compounds were added to the samples a and c in such amounts as to appear in the concentration of $10^{-3}M$ in the mixture.

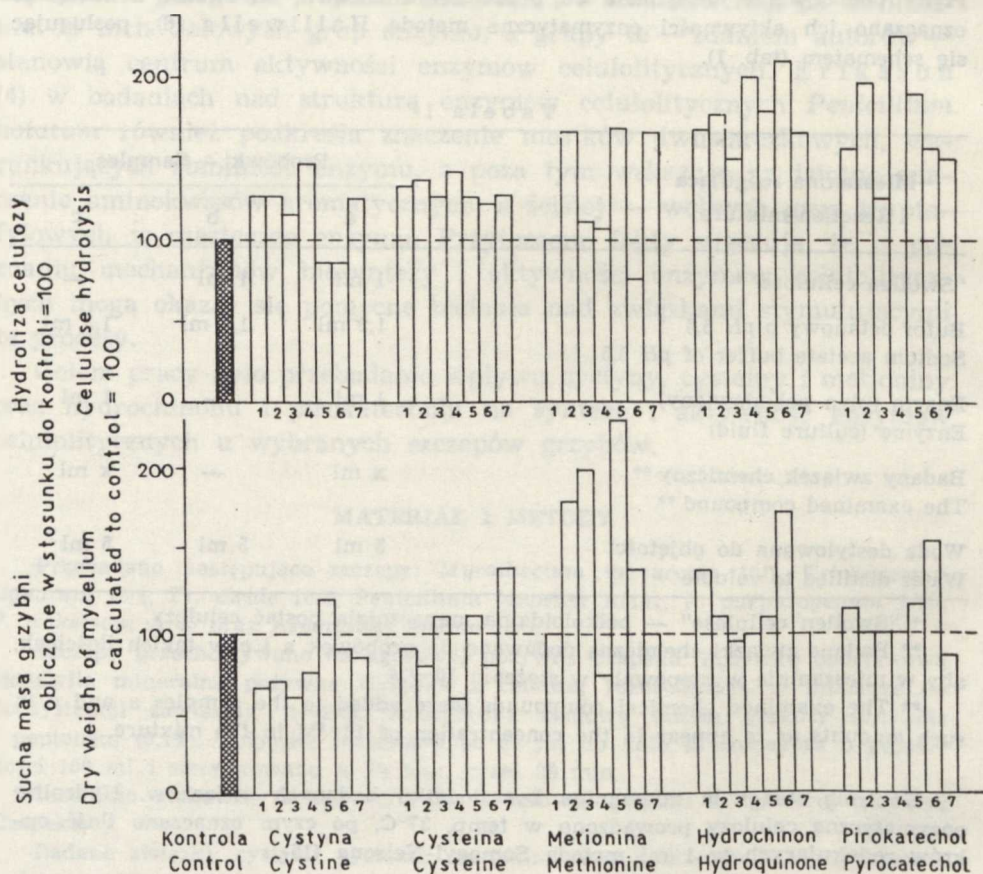
Kontrolę stanowiła mieszanina bez dodatku badanych związków. Hydrolizę enzymatyczną celulozy prowadzono w temp. 37°C, po czym oznaczano ilość cukrów redukujących w 1 ml metodą Somogyi-Nelsona (15).

WYNIKI BADAŃ

Stymulatory w podłożu hodowlanym

Jak wykazały przeprowadzone doświadczenia, badane połączenia chemiczne efektywniej oddziaływały na przebieg procesu celulolizy w podłożu hodowlanym niż na syntezę grzybni testowanych szczepów.

W hodowlach statycznych wpływ ten obserwowano wyłącznie podczas pierwszych 14 dni hodowli. Wyniki tej serii doświadczeń przedstawiono na diagramie (ryc. 1). Wpływ omawianych połączeń na szybkość wykorzystywania przez grzyby celulozy, jako jedyne źródła węgla, zależał w dużym stopniu od rodzaju wprowadzonego do podłoża związku. Spośród przebadanych przede wszystkim związki pierścieniowe: hydrochinon i pirokatechol działały stymulująco. Wysokie zużycie celulozy w podłożu hodowlanym stwierdzano zarówno w doświadczeniach ze

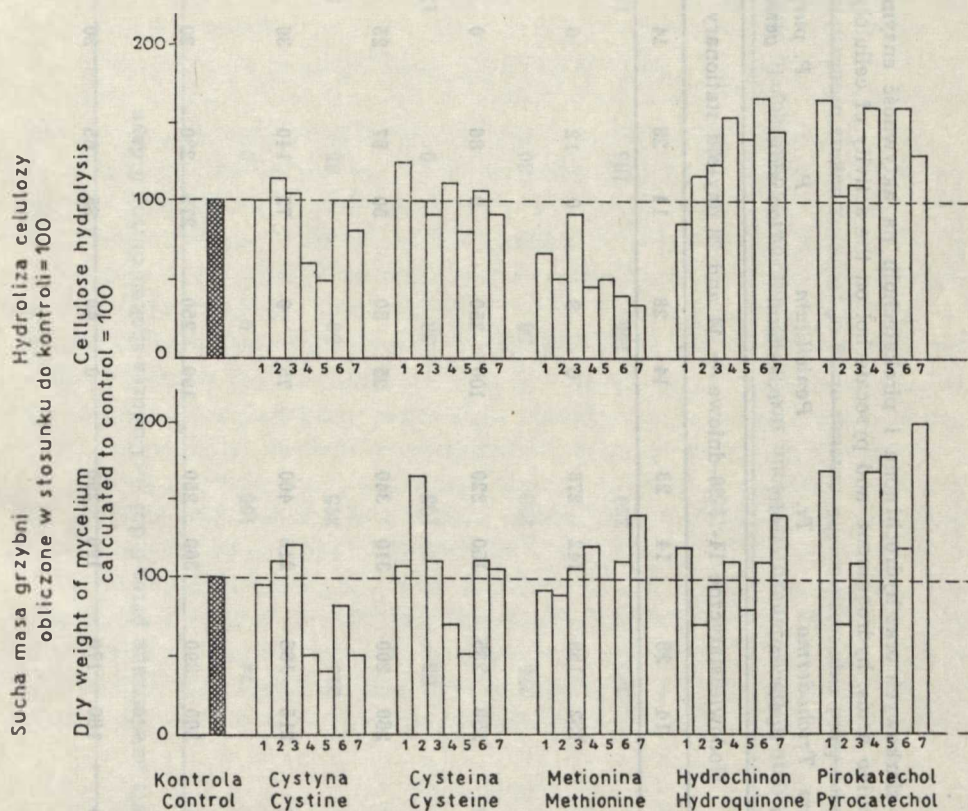


Ryc. 1. Wpływ aminokwasów siarkowych oraz hydrochinonu i pirokatecholu na ubytek celulozy i produkcję grzybni w hodowlach statycznych (stężenie badanych związków 10^{-3} M);

Effect of sulphur-containing-amino acids, hydroquinone and pyrocatechol on the cellulose uptake and mycelium production in stationary cultures (concentration of the examined compounds 10^{-3} M);

1—*Myrothecium verrucaria*, 2—*Trichoderma lignorum*, 3—*Tr. viride*, 4—*Tr. waksmani*, 5—*Penicillium lanosum*, 6—*P. purpurogenum*, 7—*Aspergillus oryzae*

szczepami aktywnymi w celulozizie, tzn. *Myrothecium* (wzrost zużycia celulozy o ok. 50% w stosunku do kontroli) i *Trichoderma* (od 30 do 90%), jak i ze szczepami mało aktywnymi: *Penicillium* (100%) i *Aspergillus* (60%). Z aminokwasów siarkowych na omówienie zasługuje przede wszystkim metionina, która jednakże efektywniej działała na syntezę grzybni niż na przebieg procesu celulozizacji u większości szczepów.



Ryc. 2. Wpływ aminokwasów siarkowych oraz hydrochinonu i pirokatecholu na ubytek celulozy i produkcję grzybni w hodowlach nawietrzanych (stężenie badanych związków 10^{-8} M); objaśnienia patrz ryc. 1

Effect of sulphur-containing-amino acids, hydroquinone and pyrocatechol on the cellulose uptake and mycelium production in shaken cultures (concentration of the examined compounds 10^{-8} M); for explanation see Fig. 1

W warunkach hodowli nawietrzanych działanie omawianych połączeń było bardziej ograniczone, jedynie hydrochinon i pirokatechol stymulowały proces zużywania celulozy przez większość badanych grzybów (ryc. 2). Stymulacja ta dotyczyła przede wszystkim szczepów mało

Tab. 2. Wpływ dodatku aminokwasów siarkowych oraz hydrochinonu i pirokatecholu na aktywność enzymów celulolitycznych *
 Effect of sulphur-containing-amino acids, hydroquinone and pyrocatechol on the activity of cellulolytic enzymes *

Badane połączenia chemiczne The examined chemical compounds	<i>Myrothecium</i> <i>verrucaria</i>		<i>Trichoderma</i> <i>lignorum</i>		<i>Tr.</i> <i>viride</i>		<i>Penicillium</i> <i>waksmani</i>		<i>P.</i> <i>lanosum</i>		<i>P. purpuro-</i> <i>genum</i>		<i>Aspergillus</i> <i>oryzae</i>	
	14	28	14	28	14	28	14	28	14	28	14	28	14	28
Hodowie statyczne 14- i 28-dniowe — 14 and 28 day-old stationary cultures														
Kontrola Control	48	120	152	158	142	276	0	8	0	12	0	8	40	32
Cystyna Cystine	40	210	150	235	150	320	100	350	0	86	0	11	63	140
Cysteina Cysteine	193	250	260	200	310	340	25	50	50	87	25	45	8	165
Metionina Methionine	75	90	215	165	215	400	75	0	72	140	30	60	75	100
Hydrochinon Hydroquinone	90	80	300	390	360	250	190	250	275	230	30	85	75	70
Pirokatechol Pyrocatechol	50	90	180	170	190	290	0	40	35	65	30	50	30	75

Hodowle nawietrzane przez 6 dni — Cultures shaken during 6 days

Kontrola	0	74	100	0	0	0	0
Control							
Cystyna	120	315	275	50	65	50	0
Cystine							
Cysteina	0	65	105	38	0	130	50
Cysteine							
Metionina	60	275	250	50	30	0	0
Methionine							
Hydrochinon	475	220	230	160	185	130	0
Hydroquinone							
Pirokatechol	45	185	125	0	50	0	55
Pyrocatechol							

* Aktywność enzymatyczna 1 ml płynu pochodzącego wyrażona ilością μg cukrów redukujących, otrzymanych w wyniku hydrolizy celulozy.

* Enzymic activity of 1 ml of culture fluid expressed as the amount of μg of reducing sugars obtained as a result of the cellulose hydrolysis.

aktywnych w celulozie, tzn. *Penicillium* i *Aspergillus*. O ile hydrochinon oddziaływał wyłącznie na intensywność celulozy, to pirokatechol wpływał także aktywująco na syntezę grzybni u tych szczepów.

Dodatek aminokwasów siarkowych do podłoża hodowlanych w kilku doświadczeniach hamował przebieg omawianych procesów. Cystyna na przykład redukowała przyrost biomasy u szczepów mało aktywnych, a metionina hamowała syntezę enzymów celulozowych u wszystkich badanych szczepów.

Stymulatory w mieszaninie reagującej

Wprowadzenie omawianych połączeń chemicznych do mieszaniny reagującej miało na celu stwierdzenie, czy i w jakim stopniu aktywują one wyprodukowane enzymy celulozowe. Badaniom poddano płyny pochodzące z hodowli statycznych i nawietrzanych, po dokładnym odwirowaniu, celem wyeliminowania wpływu grzybni.

W wyniku doświadczeń (tab. 2) stwierdzono, że wszystkie związki chemiczne, z wyjątkiem pirokatecholu, aktywowały płyny pochodzące z większości badanych szczepów. Na przykład aminokwasy siarkowe, głównie cystyna i cysteina, zwiększały aktywność enzymatyczną celuloz wyprodukowanych przez grzyby w warunkach hodowli statycznej. Dodatek hydrochinonu wpływał przede wszystkim na płyny pochodzące z szczepów *Trichoderma*, pochodzące zarówno z hodowli statycznych, jak i nawietrzanych. W obu typach hodowli interesujące wyniki uzyskano w doświadczeniach z mało aktywnymi szczepami *Penicillium* i *Aspergillus*, których kontrolne płyny pochodzące z hodowli statycznych miały zerowe albo bardzo niskie aktywności. W takich przypadkach wprowadzenie do mieszaniny reagującej na przykład hydrochinonu w znacznym stopniu przywracało aktywność obecnym enzymom celulozowym.

DYSKUSJA

Wpływ aminokwasów siarkowych oraz hydrochinonu i pirokatecholu na syntezę i aktywność grzybowych enzymów celulozowych ujawnił różnice w sposobie oddziaływania tych połączeń na przebieg procesu celulozy.

Związkami, które efektywnie stymulowały syntezę enzymów, były hydrochinon i pirokatechol. Wydaje się, że działanie to można tłumaczyć za Liu i Kingiem (9) uaktywnianiem kompleksu enzymatycznego C₁, niezbędnego we wstępnej fazie upłynnienia celulozy w podłożu hodowlanym. Omawiany wpływ obserwowano zarówno w warunkach hodowli statycznej, jak i nawietrzanej. Wpływ pozostałych po-

łączeń uwidaczniał się jedynie w hodowli statycznej. Nawietrzanie środowiska hodowlanego wyraźnie osłabiało syntezę celulaz, a w doświadczeniach z metioniną nawet działało hamująco. Analogiczne zjawisko hamowania biosyntezy enzymów celulolitycznych w warunkach tlenowych stwierdzili Norkrans (17) oraz Lyr i Schanel (10).

Aminokwasy siarkowe — jak wykazano — w słabszym stopniu oddziaływały na biosyntezę celulaz, natomiast wyraźnie zwiększały aktywność enzymatyczną płynów pochodzących. Cystyna i cysteina uaktywniały enzymy wyprodukowane zarówno przez szczepy bardzo aktywne, jak i mało aktywne w celulolizie. Potwierdzałyby to sugestie Sisona, Schuberta i Norda (20) o odblokowywaniu zainaktywowanych enzymów w płynach pochodzących przez aminokwasy siarkowe.

W przeprowadzonych doświadczeniach podobnie aktywujące działanie wykazywał hydrochinon. Zatem stymulującego działania hydrochinonu nie można tłumaczyć jedynie uaktywnianiem kompleksu enzymatycznego C₁, ponieważ jest to mechanizm działający w warunkach hodowlanych. Wydaje się natomiast, że hydrochinon może wpływać na kształtowanie się potencjału oksydacyjno-redukcyjnego w kierunku optymalnym dla aktywności tych enzymów.

WNIOSKI

1. Hydrochinon i pirokatechol stymulowały biosyntezę, a aminokwasy siarkowe i hydrochinon — aktywność grzybowych enzymów celulolitycznych.
2. Najlepsze wyniki otrzymano w doświadczeniach ze szczepami *Trichoderma*.
3. Badane związki chemiczne wpływały dodatnio na przebieg procesu celulolizy u szczepów mało aktywnych — *Penicillium* i *Aspergillus*.

PISMIENNICTWO

1. Ashour W. E.: Pectinase Production by *Botritis cinerea* and *Pythium debaryanum*. Trans. Brit. Myc. Soc., 37, 343—352 (1954).
2. Basu N. S., Whitaker D. R.: Inhibition and Stimulation of the Cellulase of *Myrothecium verrucaria*. Arch. Biochem. Biophys., 42, 12—24 (1953).
3. Davies R.: Enzyme Formation in *Saccharomyces fragilis*. Biochem. J., 55, 484—497 (1953).
4. Eriksson K.: Studies on Cellulolytic and Related Enzymes. Sartryck ur Svensk Kemisk Tidskrift 12/67, Stockholm 1967, 1—20.
5. Eriksson K., Pettersson G.: Studies on Cellulolytic Enzymes. V. Some Structural Properties of the Cellulase from *Penicillium notatum*. Arch. Biochem. Biophys., 124, 160—166 (1968).
6. Halliwell G.: Cellulose [w:] Methods of Enzymatic Analysis, Ed. H. U. Bergmeyer, Academic Press, London—New York 1963, 64—71.

7. Horton J. C., Keen N. T.: Regulation of Induced Cellulase Synthesis in *Pyrenochaeta terrestris* Gorenz et. al. by Utilizable Carbon Compounds. *Can. J. Microb.*, **12**, 209—219 (1966).
8. Keen N. T., Horton J. C.: Induction and Repression of Endopolygalacturonase Synthesis by *Pyrenochaeta terrestris*. *Can. J. Microb.*, **12**, 443—453 (1966).
9. Liu T. H., King K. W.: Fragmentation during Enzymic Degradation of Cellulose. *Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 462 (1967).
10. Lyr H., Schanel L.: Über die Cellulase-Bildung von *Fomes marginatus* Gill. *Zt. Allgem. Mikrob.*, **4**, 341—349 (1964).
11. Mandels M., Reese E. T.: Induction of Cellulase *Trichoderma viride* as Influenced by Carbon Source and Metals. *J. Bact.*, **73**, 269—278 (1957).
12. Mandels M., Reese E. T.: Biologically Active Impurities in Reagent Glucose. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1**, 338—340 (1959).
13. Mandels M., Reese E. T.: Induction of Cellulase in Fungi by Cellobiose. *J. Bact.*, **79**, 816—826 (1960).
14. Mandels M., Parrish F. W., Reese E. T.: Sophorose, as an Inducer of Cellulase in *Trichoderma viride*. *J. Bact.*, **83**, 400—408 (1962).
15. Nelson N.: A Photometric Adaptation of Somogyi Method for the Determination of Glucose. *J. Biol. Chem.*, **183**, 375—380 (1944).
16. Norkrans B., Hammarström A.: Studies on Growth of *Rhizina undulata* Fr. and its Production of Cellulase- and Pectin-decomposing Enzymes. *Physiol. Plant.*, **16**, 1—10 (1963).
17. Norkrans B.: Influence of some Cultural Conditions on Fungal Cellulase Production. *Physiol. Plant.*, **16**, 11—19 (1963).
18. Reese E. T., Birzgalis R., Mandels M.: Sucrases in Fungi. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **40**, 273—283 (1962).
19. Reese E. T., Lola J. E., Parrish F. W.: Modified Substrates and Modified Products as Inducers of Carbohydrates. *J. Bact.*, **100**, 1151—1154 (1969).
20. Sison B. C., Schubert W. J., Nord F. F.: On the Mechanism of Enzyme Action. A Cellulolytic Enzyme from the Mold *Poria vaillantii*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**, 260—272 (1958).

РЕЗЮМЕ

Исследовали влияние цистина, цистеина, метионина, гидрохинона и пирокатехола на синтез и активность целлюлолитических энзимов следующих штаммов: *Myrothecium verrucaria*, *Trichoderma lignorum*, *Tr. viride*, *Penicillium lanosum*, *P. waksmani*, *P. purpurogenum*, *Aspergillus oryzae*.

Добавление гидрохинона и пирокатехола в питательную среду наиболее эффективно стимулировало, особенно в условиях стационарного разведения, синтез целлюлолитических энзимов всех грибов. Опыты с бесклеточными жидкостями после выращивания культур показали, что серные аминокислоты и гидрохинон действовали как активаторы целлюлаз. Эта активация отчетливо выступала у штаммов *Trichoderma*

независимо от условий разведения (поверхностные культуры или глубинные (накасалки)).

Все исследованные соединения имели также большое влияние на ход процесса целлюлолизы у малоактивных грибов, как, например, исследованные штаммы *Penicillium* и *Aspergillus*.

SUMMARY

The effects of cystine, cysteine, methionine, hydroquinone and pyrocatechol on the synthesis and activity of cellulolytic enzymes of *Myrothecium verrucaria*, *Trichodema lignorum*, *Tr. viride*, *Penicillium lanosum*, *P. waksmani*, *P. purpurogenum* and *Aspergillus oryzae* were studied.

The addition of hydroquinone and pyrocatechol to the culture medium stimulated most effectively — particularly under stationary conditions — the synthesis of cellulolytic enzymes by all fungi. Experiments with cell free culture filtrates showed that the sulphur-containing-amino acids and hydroquinone acted as activators of the cellulases. The activation was most pronounced with *Trichoderma* strains, independently of the culture conditions (stationary or shaken).

All chemical compounds also had a great influence on the poor producers of cellulolytic enzymes, e.g. *Penicillium* and *Aspergillus* strains studied.

