

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS  
Zakład Biochemii

Jerzy TROJANOWSKI, Andrzej LEONOWICZ,  
Bogdan KOWALSKI

**Wpływ kwasów lignosulfonowych i fenolowych produktów rozkładu  
ligniny na wzrost i syntezę białka u niektórych *Hymenomyces***

Влияние лигносульфоновой кислоты и феноловых продуктов разложения лигнина  
на увеличение некоторых *Нименомицетес* и синтез белка

Effect of Lignosulfonic Acids and Phenolic Lignin Degradation Products on  
Growth and Protein Synthesis in some *Hymenomyces*

Wytwarzanie lakazy i peroksydazy u wielu gatunków grzybów wyższych indukowane jest przez substraty fenolowe bądź ligninę (1, 3, 5, 6). Często indukcji wymienionych enzymów towarzyszy przyrost masy mycelium. Szczególnie przekonujące wyniki w tym zakresie osiągnął Flaig, wprowadzając do kultury *Polystictus* sp. kwas wanilinowy, protocatechowy bądź p-hydroksybenzoesowy w koncentracjach rzędu  $10^{-3}$  M (2). Robbins i współprac. wykazali stymulujący wpływ wodnego wyciągu z drewna bukowego na wzrost *Polyporus schweinitzii*. Autorzy przypuszczają, że głównym czynnikiem wzrostowym jest tu kwas ferulowy oraz izoeugenol (8, 9, 10).

Interesujące są również próby całkowitego zastąpienia glukozy w pożywce fenolowym źródłem węgla, np. ligniną naturalną lub kwasami lignosulfonowymi pochodzącymi z odcieków po produkcji celulozy. Wykorzystanie tego ostatniego substratu byłoby szczególnie cenne zarówno z punktu widzenia detoksykacji odcieków, jak i produkcji biomasy grzybowej do celów paszowych (7).

Celem niniejszej pracy było prześledzenie wpływu kwasów lignosulfonowych oraz niektórych metoksyfenoli na wzrost i biosyntezę białka w wybranych gatunkach *Hymenomyces*.

## MATERIAŁ I METODY

## Szczepy grzybów i odczynniki

Do badań użyto następujących szczepów grzybowych: *Polystictus versicolor* (L. Fr. C. B. S.)-KMR-10, *Trametes versicolor* (L. ex Fr.) Pil. HMJPC nr 4838, *Trametes pubescens* (Schum. ex Fr.) Pil., HMJPC nr 5048, *Xanthochrous pini* (szczep B Muzeum Zakładu Biochemii UMCS—Lublin). Szczepy przechowywano na skosach agarowych (11). Odciek z produkcji celulozy pozbawiony cukrów przez spirytusowanie i drożdżowanie, zawierający kwasy lignosulfonowe, jako podstawowy składnik suchej masy, uzyskano z Niedomickich Zakładów Celulozy. Kwasy ferulowy i protokatechowy otrzymano z firmy Koch-Light Laboratories LTD Colnbrook-England.

## Pożywki

Do badań używano dwu rodzajów pożywek mineralnych: 1) glukozowej wg Lindeberga i Holm (4), częściowo zmodyfikowanej, oraz 2) pożywki wg własnego układu, w której źródłem węgla były pozbawione cukrów odcieki pocelulozowe. Skład pożywki glukozowej: glukoza 10 g, asparagina 1 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5 g,  $KH_2PO_4$  0,45 g,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  0,47 g, Ca 20  $\mu g$ , Mn 2,7  $\mu g$ , Fe, Zn, Cu 1  $\mu g$ , tiamina 50  $\mu g$ , woda destylowana do 1000 ml. Kwas protokatechowy (1 mM) i ferulowy (1 mM) w wariancie „fenolowym” dodawano do hodowli po 5 dniach inkubacji grzybni. Mineralny skład pożywki bezglukozowej, w której źródłem węgla są ługi posulfitowe (5% suchej masy) jest treścią zastrzeżenia patentowego (Urząd Patentowy PRL). Pożywki w porcjach po 50 ml w kolbach stożkowych obj. 300 ml sterylizowano w aparacie Kocha 3 razy po 45 min. w odstępach dobowych.

## Kultury grzybów

Wymienione wyżej gatunki grzybów przeszczepiano z kultur wyjściowych rosnących na 3% roztworze brzojki piwnej. Kolby z przeszczepionymi grzybami umieszczano w termostacie w temp. 24°.

## Oznaczanie masy grzybni

Po odsączeniu pożywki na leжку Büchnera grzybnię 4-krotnie płukano wodą, suszono do stałej masy w temp. 65° i ważono.

## Oznaczanie białka w mycelium i filtracie

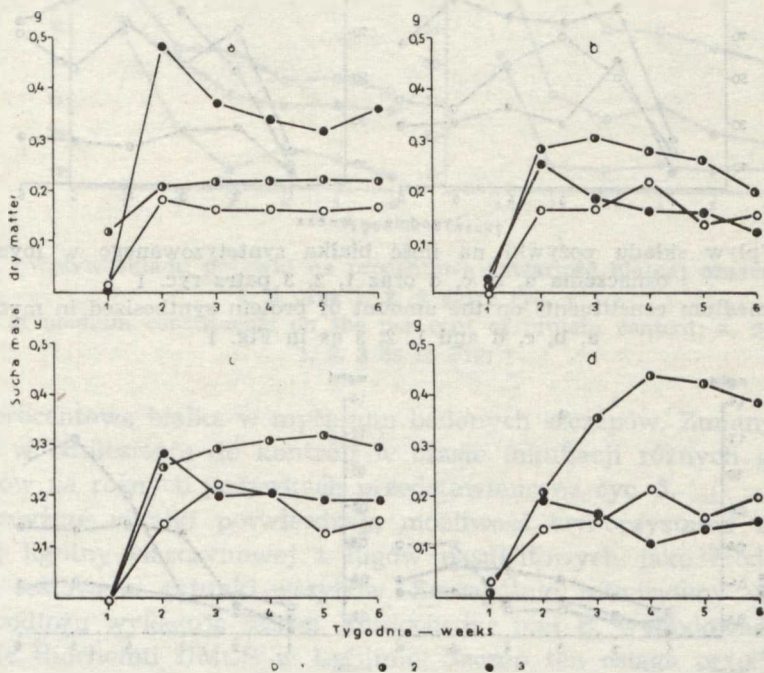
Białko mycelium i pożywki oznaczano metodą Kiejdahla: 8—10 mg suszonej grzybni lub suchej pozostałości po odparowaniu pożywki ogrzewano 2 godz. na małym płomieniu w kolbie Kiejdahla z 3 ml stężonego  $H_2SO_4$  oraz 1 godz. intensywnie w obecności 1 g mieszaniny katalizującej o składzie 80% wagowych  $K_2SO_4$ , 19,5%  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  i 0,5% metalicznego selenu (pył). Podczas drugiego ogrzewania ciemnobrunatny roztwór stawał się stopniowo przezroczysty. Po ostudzeniu preparat zawieszano w 20 ml wody, przenoszono do kolby destylacyjnej aparatu Parnasa-Wagnera i dodawano 20—30 ml 30% NaOH. Wydzielający się amoniak destylowano z parą wodną do odbieralnika zawierającego 10 ml 2% kwasu borowego ze



wskaźnikiem Tashiro do zmiany zabarwienia z niebieskofioletowego na zielone i nagromadzenia się 20 ml kondensatu. Zawartość odbieralnika miareczkowano 0,01 n HCl. 1 ml 0,01 n HCl użytego do miareczkowania odpowiadał w tych warunkach 0,14 ml azotu. Od wyniku tego odejmowano wartość próby kontrolnej. W celu obliczenia zawartości białka stosowano mnożnik 6,25.

### WYNIKI I DYSKUSJA

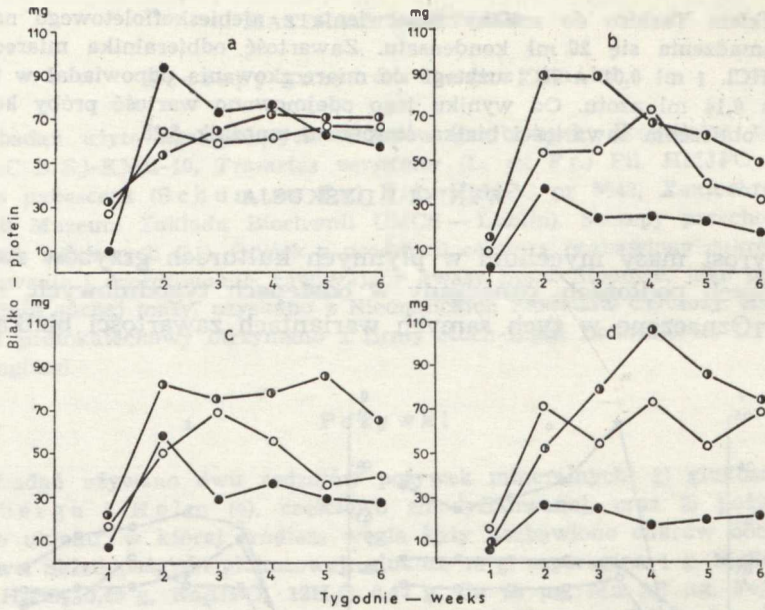
Przyrost masy mycelium w płynnych kulturach grzybów rosnących na różnych podłożach, oznaczany w odstępach tygodniowych, ilustruje ryc. 1. Oznaczone w tych samych wariantach zawartości białka przed-



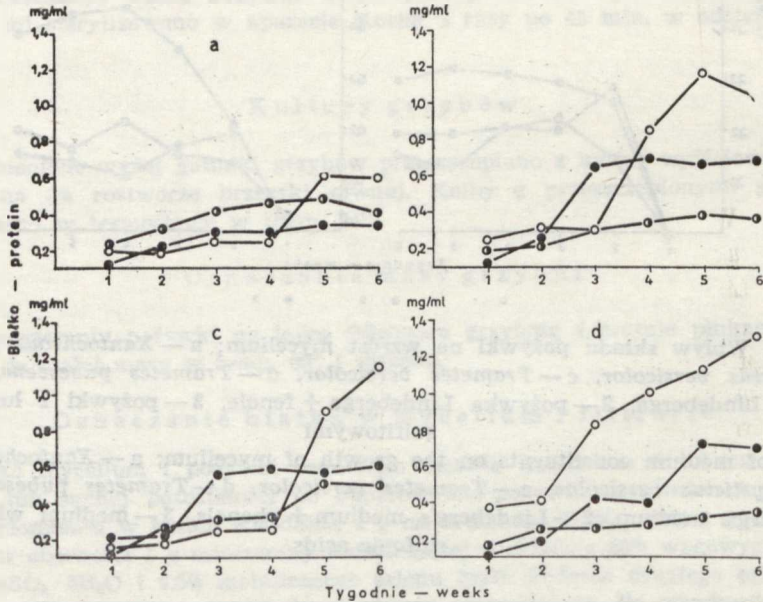
Ryc. 1. Wpływ składu pożywki na wzrost mycelium; a—*Xanthochrous pini*, b—*Polystictus versicolor*, c—*Trametes versicolor*, d—*Trametes pubescens*; 1—pożywka Lindeberga, 2—pożywka Lindeberga + fenole, 3—pożywki z ługami polysulfitowymi

Effect of medium constituents on the growth of mycelium; a—*Xanthochrous pini*, b—*Polystictus versicolor*, c—*Trametes versicolor*, d—*Trametes pubescens*; 1—Lindeberg's medium, 2—Lindeberg's medium + phenols, 3—medium with lignosulfonic acids

stawione są na ryc. 2. Ryc. 3 ilustruje oznaczenia ilości białka wydzielonego przez mycelium do środowiska w zależności od czasu wzrostu na różnych pożywkach. Na ryc. 4 podano wpływ składu pożywki na zawar-

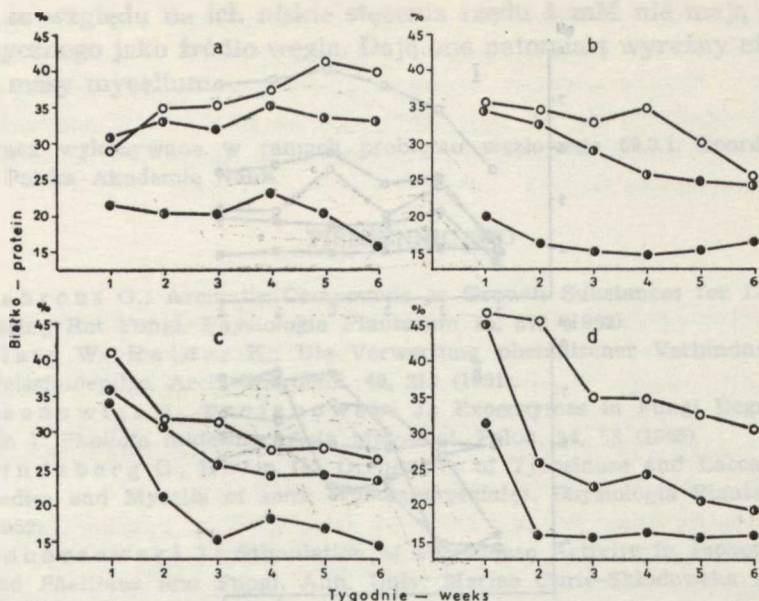


Ryc. 2. Wpływ składu pożywki na ilość białka syntetyzowanego w mycelium; oznaczenia a, b, c, d oraz 1, 2, 3 patrz ryc. 1  
Effect of medium constituents on the amount of protein synthesized in mycelium; a, b, c, d and 1, 2, 3 as in Fig. 1



Ryc. 3. Wpływ składu pożywki na ilość białka wydzielonego do środowiska przez mycelium; oznaczenia a, b, c, d oraz 1, 2, 3 patrz ryc. 1  
Effect of medium constituents on the amount of protein excreted by mycelium into the medium; a, b, c, d and 1, 2, 3 as in Fig 1





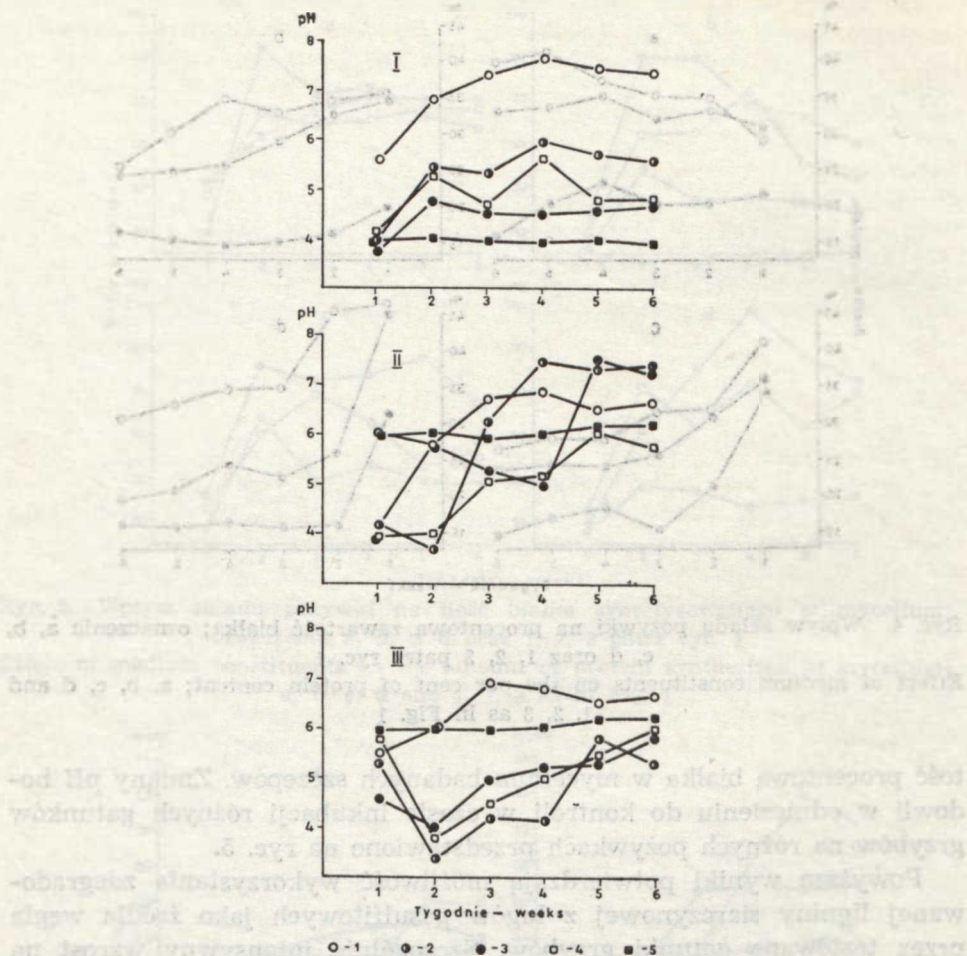
Ryc. 4. Wpływ składu pożywki na procentową zawartość białka; oznaczenia a, b, c, d oraz 1, 2, 3 patrz ryc. 1

Effect of medium constituents on the per cent of protein content; a, b, c, d and 1, 2, 3 as in Fig. 1

tość procentową białka w mycelium badanych szczepów. Zmiany pH hodowli w odniesieniu do kontroli w czasie inkubacji różnych gatunków grzybów na różnych pożywkach przedstawiono na ryc. 5.

Powyższe wyniki potwierdzają możliwość wykorzystania zdegradowanej ligniny siarczynowej z ługów posulfitowych jako źródła węgla przez testowane gatunki grzybów. Szczególnie intensywny wzrost na tym podłożu wykazuje szczep *Xanthochrous pini* B, wyhodowany w Zakładzie Biochemii UMCS w Lublinie. Szczep ten osiąga przeciętnie od 100 do 150% większy przyrost biomasy w porównaniu z kulturą kontrolną (ryc. 1). Wymieniony szczep wykazuje równocześnie najwyższą średnią zawartość białka w mycelium w warunkach wzrostu na pożywce z ługami posulfitowymi (ryc. 2).

Dodatek mieszaniny kwasu protokatechowego i ferulowego w stężeniu  $10^{-3}$  M do pożywki Lindeberga wyraźnie stymuluje zarówno wzrost badanych gatunków (ryc. 1), jak i biosyntezę białka (ryc. 2). Najwyraźniejszy przy tym efekt zaobserwowano u *Trametes pubescens*, który po 4 tygodniach inkubacji wykazywał w porównaniu z wariantem kontrolnym większy o 100% przyrost biomasy (ryc. 1) i większy o 40% przyrost białka (ryc. 2). U wszystkich badanych gatunków zaznacza się wyraźnie preferencja stymulacji biomasy mycelium w porównaniu z bio-



Ryc. 5. Zmiany pH środowiska pod wpływem I—ługów posulfitowych, II—pożywki Lindeberga, III—pożywki Lindeberga z fenolami w zależności od czasu hodowli; 1—*Xanthochrous pini*, 2—*Polystictus versicolor*, 3—*Trametes versicolor*, 4—*Trametes pubescens*, 5—kontrola bez grzyba  
 pH changes of medium by I—lignosulfonic acids, II—Lindeberg's medium, III—Lindeberg's medium with phenols in relation to the time of culture; 1—*Xanthochrous pini*, 2—*Polystictus versicolor*, 3—*Trametes versicolor*, 4—*Trametes pubescens*, 5—control without fungus

syntezą białka. W efekcie obserwuje się relatywne obniżanie poziomu białka w mycelium rosnącym na pożywce fenolowej (ryc. 4). Obniżanie to waha się od 4 do 40% w zależności od gatunku. Wyjątek stanowi tu również *Xanthochrous pini* B, gdzie zaobserwowano w wariancie „fenolowym” przyrost poziomu białka średnio o 10% (ryc. 4).

Występujące w pożywce „fenolowej” kwasy protokatechowy i feru-



lowy ze względu na ich niskie stężenia rzędu 1 mM nie mają znaczenia praktycznego jako źródło węgla. Dają one natomiast wyraźny efekt przyrostu masy mycelium.

Praca wykonywana w ramach problemu węzłowego 09.3.1. koordynowanego przez Polską Akademię Nauk.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Fahreus G.: Aromatic Compounds as Growth Substances for Laccase-producing Rot Fungi. *Physiologia Plantarum* 15, 572 (1962).
2. Flaig W., Haider K.: Die Verwertung phenolischer Verbindungen durch Weissfäulepilze. *Arch. Microbiol.* 40, 212 (1961).
3. Leonowicz A., Trojanowski J.: Exoenzymes in Fungi Degrading Lignin I. *Pholiota mutabilis*. *Acta Microbiol. Polon.* 14, 55 (1965).
4. Lindeberg G., Holm G.: Occurrence of Tyrosinase and Laccase in Fruit Bodies and Mycelia of some *Hymenomycetales*. *Physiologia Plantarum* 5, 100 (1952).
5. Łobarzewski J.: Stimulation of Peroxidase Activity in *Inonotus radiatus* and *Phellinus pini* Fungi. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C* 25, 15 (1970).
6. Łobarzewski J., Sikora A.: Wpływ fenoli na aktywność peroksydazy w hodolach płynnych grzyba *Inonotus radiatus*. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C*, 27 (1972).
7. Modzelewska J.: Badania nad możliwością wykorzystania łągów posulfitowych do produkcji białka grzybowego. Praca magisterska z Katedry Biochemii UMCS. Lublin 1969.
8. Robbins W. J., Hervey A.: Growth Substances for *Polyporus schweinitzii*. *Mycologia* 52, 946 (1960).
9. Robbins W. J., Hervey A.: Unidentified Growth Factors for *Polyporus schweinitzii*. *Mycologia* 61, 808 (1969).
10. Robbins W. J., Page A. C., Gale P. H., Hoffman C. M., Moscatelli E. A., Koniuszy F. R., Smith M. C., Folkers K.: Growth Factors for *Polyporus schweinitzii*. The Identification of Ferulic Acid as New Cofactor. *Mycologia* 55, 742 (1963).
11. Trojanowski J., Leonowicz A.: Investigation on the Degradation of Lignin by *Pholiota mutabilis*. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C*, 18, 441 (1963).

#### РЕЗЮМЕ

Грибы *Polystictus versicolor*, *Trametes versicolor*, *Trametes pubescens* и *Xanthochrous pini* выращивали на питательной минеральной среде, обогащенной отработанным сульфитным щелоком продукции целлюлозы, сульфитным методом. У всех тестируемых видов, по сравнению с контрольным выращиванием без сульфитного щелока, наблюдалось увеличение биомассы, напр. у *Xanthochrous pini* в 2,5 раза.

Одновременно исследуемые виды инкубировали на минеральной питательной среде с добавлением мМ ферульной и протокатехиновой кислот. Констатирована высокая стимуляция роста исследуемых видов и биосинтеза белка, при этом лучшие результаты наблюдались у *Trametes pubescens* (двукратное увеличение биомассы и полуторакратное увеличение белка).

## SUMMARY

*Polystictus versicolor*, *Trametes versicolor*, *Trametes pubescens* and *Xanthochrous pini* fungi were cultured in a mineral medium enriched with sulphite waste liquor from cellulose production by the sulphite method. An increase in the biomass of all the species tested was found to be higher than that of the control without sulphite waste liquor; for instance, it was 2.5 times higher in *Xanthochrous pini*.

At the same time, the species were incubated in a mineral medium enriched with mM of ferulic and protocatechuic acids. It was shown that stimulation of the species growth and of protein biosynthesis was high, being the highest in *Trametes pubescens* (2-fold increase in biomass and 1.5-fold increase in protein).