ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA
VOL. XXXII, 15 SECTIO C 1977

Instytut Chemii i Technologii Rolnej AR w Lublinie
Zakład Technologii Rolnej

Ewa KISIELEWSKA

Poszukiwanie i selekcja szczepów grzybów niższych wytwarzających enzymy ksylanolityczne

Поиски и селекция штаммов низших грибов, производящих ксиланолитические энзимы

Isolation and Selection of Fungi Producing Xylanase Enzymes

WSTĘP

Preparaty enzymatyczne pochodzenia mikrobiologicznego znalazły ważne zastosowanie w przemyśle, dlatego przeprowadzane są liczne badania mające na celu poszukiwanie mikroorganizmów wydajnych w syntezie enzymów.

Gleba jest typowym środowiskiem, w którym odbywają się procesy hydrolizy materiału roślinnego. Każdego roku trafia do gleby wiele resztek roślinnych zawierających duże ilości pektyny, ksylanu, celulozy i ligniny. Ich oporność na rozkład biologiczny kształtuje się w wymienionej kolejności, a w procesie rozkładu biorą udział bakterie, promieniowce i grzyby.

Wyniki licznych badań wskazują, że zarówno ksylan w naturalnej postaci zawarty w materiale roślinnym, jak i wydzielony w czystej postaci jest dość łatwo rozkładany przez różne mikroorganizmy glebowe. Ziemięcka (20) wyizolowała z gleby o odczynie obojętnym szczep bakterii należących do gatunku *Bacillus xylanophagus*, który charakteryzował się wysoką aktywnością ksylanolityczną. Domsch i Gams (3) przebadali 300 świeżo wyosobnionych szczepów grzybów glebowych, poszukując producentów enzymów rozkładających pektynę, ksylan i celulozę. Największą aktywnością w rozkładzie ksylanu odznaczał się gatunek *Phoma eupyrena*.

Celem podjętych badań było pozyskanie szczepów grzybów niższych, aktywnych w rozkładzie ksylanu.

METODY

Izolowanie grzybów z gleb użytkowanych ogrodniczo

Do izolacji używano pożywki Martina (9) z dodatkiem 30 mg/l aureomycyny. Glebę rozcieńczano tak, aby otrzymać na jednej płytce nie więcej niż 20 kolonii grzybów. Po zaszczepieniu podłoża zawiesiną gleby hodowle namnażające przetrzymywano przez 10 dni w temp. 28°C. Wyrosłe kolonie grzybów przeszczepiano na pożywkę ziemniaczaną wg Toussoun i Nelsona (17). W celu określenia przynależności systematycznej wyosobnionych szczepów grzybów zakładano ich mikrokultury, które przetrzymywano w temp. 28°C aż do chwili wytworzenia ciał owocujących. Przy oznaczaniu przynależności rodzajowej szczepów posługiwano się kluczami Barnetta (1) i Gilmana (4).

Wydzielanie ksylanu ze słomy pszennej

Materiał roślinny (słoma pszenna) przygotowywano wg Jermyn i Isherwooda (8). Holocelulozę i surowy ksylan otrzymano wg Whistlera, Bachracha i Bowmana (18). Do oznaczeń aktywności enzymatycznej używano koloidalnego roztworu ksylanu wg Sørensena (12).

Oznaczenie aktywności ksylanolitycznej

Wszystkie szczepy grzybów hodowano na pożywce Czapeka bez sacharozy. Jedynym źródłem węgla była sproszkowana słoma. Doświadczenia prowadzono w celu określenia szybkości wzrostu grzybni. Szczepy wykazujące dobry i szybki wzrost na tym podłożu przeznaczono do dalszych badań enzymatycznych. Spośród licznych metod określania aktywności wybrano metodę płytkową podaną przez Hampel i Szajera (6), a ilość rozłożonego ksylanu oznaczano wg wzoru:

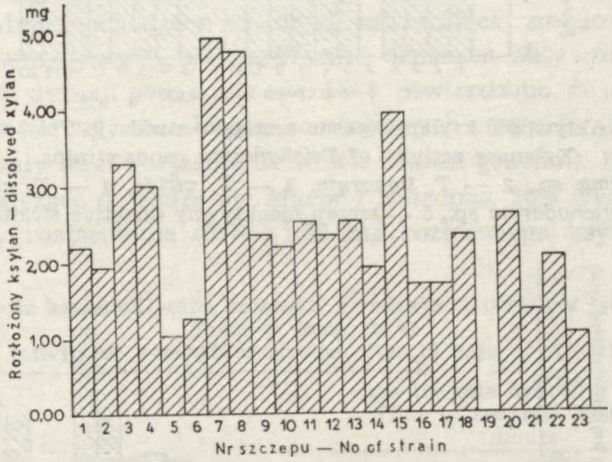
$$\Pi \cdot h(r_x^2 - r_0^2) \cdot c$$

gdzie: h — grubość warstwy testowej agaru, r_0 — promień grzybni, r_x — promień grzybni+promień strefy rozjaśnienia, c — ilość mg ksylanu w 1 mm³ pożywki testowej.

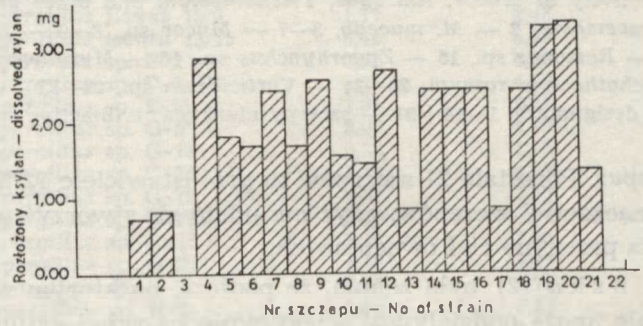
Aktywność w hodowlach płynnych określano kolorymetrycznie metodą Samogyi-Nelsona wg Gjertsen (5). W hodowlach płynnych stosowano podłoże Saundersa (11) z dodatkiem sproszkowanej słomy w ilości 20 g/l jako jedynego źródła węgla. Po 10 dniach hodowli stacjonarnych w temp. 28°C i *pH* 5,5 płyny hodowlane oddzielano od grzybni, dializowano je i oznaczano w nich aktywność ksylanolityczną. Mieszanina reagująca zawierała 1 ml 1% roztworu ksylanu, 1,3 ml buforu octanowego o *pH* 5,5, 1 ml badanego płynu hodowlanego i trzy krople toluenu. Po zakończonej hydrolizie oznaczano 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 pohodowlanego w ciągu 1 godz.

WYNIKI I DYSKUSJA

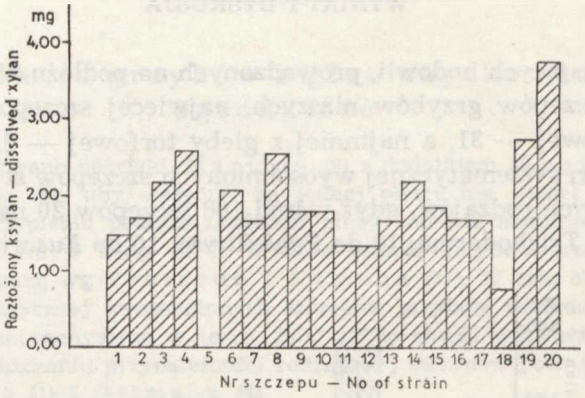
Z namnażających hodowli, prowadzonych na podłożu Martina, wyosobniono 108 szczepów grzybów niższych, najwięcej szczepów wyizolowano z gleby liściowej — 31, a najmniej z gleby torfowej — 3. Po oznaczeniu przynależności systematycznej wyosobnionych szczepów stwierdzono przewagę niektórych rodzajów, gdyż wśród 108 szczepów 20 należało do *Aspergillus*, 20 do *Trichoderma*, 19 do *Penicillium*, 10 do *Fusarium*, 6 do *Mucor*



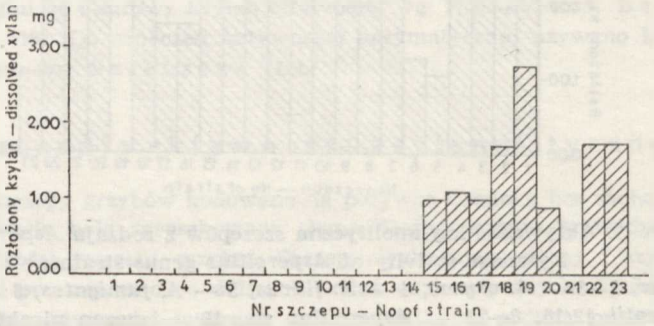
Ryc. 1. Aktywność ksylanolityczna szczepów z rodzaju *Aspergillus;*
Xylanase activity of *Aspergillus* genus strains;
1 — *A. niger*, 2—3 — *A. oryzae*, 4 — *A. flavus*, 5 — *A. fumigatus*, 6 — *A. awamorii*, 7 — *A. wentii* 13/15, 8—23 — *Aspergillus* sp., 19 — szczep nieaktywny (inactive strain)



Ryc. 2. Aktywność ksylanolityczna szczepów z rodzajów *Penicillium* i *Fusarium*;
Xylanase activity of *Penicillium* and *Fusarium* genera strains;
1 — *P. chrysogenum*, 2 — *P. purpurogenum*, 3 i 22 — *Penicillium* sp. — szczepy nieaktywne (inactive strains), 4—6 — *Fusarium* sp., 7 — *F. culmorum*, 8 — *F. oxysporum*, 9 — *F. bulbigenum*, 10—11 — *F. oxysporum*, 12—21 — *Fusarium* sp.



Ryc. 3. Aktywność ksylanolityczna szczepów z rodzaju *Trichoderma;*
Xylanase activity of *Trichoderma* genus strains
1 — *Trichoderma* sp., 2 — *T. lignorum*, 3 — *T. viride*, 4 — *T. album*, 5—20 — *Trichoderma* sp., 5 — szczep nieaktywny (inactive strain)



Ryc. 4. Aktywność ksylanolityczna szczepów z rodzaju *Mucor, Rhizopus, Trichothecium* i innych;
Xylanase activity of *Mucor, Rhizopus, Trichothecium* and other genera strains
1 — *Mucor racemosus*, 2 — *M. mucedo*, 3—7 — *Mucor* sp., 8—9 — *Rhizopus nigricans*, 10—14 — *Rhizopus* sp., 15 — *Zygorhynchus* sp., 16 — *Myrothecium verrucaria*, 17—19 — *Trichothecium roseum*, 20—21 — *Verticillium* sp., 22—23 — nie oznaczone (not designated), 1—14 i 21 — szczepy nieaktywne (inactive strains)

i 5 do *Rhizopus*. Pozostałe 21 szczepów to przedstawiciele 12 innych rodzajów. Nie oznaczono 7 szczepów, gdyż nie udało się stworzyć warunków do wytworzenia przez nie ciał owocujących.

Czaplińska (2) była zdania, że podłoże, na którym wyosobnia się drobnoustroje, może oddziaływać selektywnie na skład gatunkowy szczepów grzybów. Podczas badań otrzymałam przeważającą ilość szczepów należących do rodzaju *Aspergillus, Trichoderma* i *Penicillium*. Jest również możliwe, że w glebach ogrodniczych, bogatych w resztki roślinne, te właśnie rodzaje grzybów znalazły sprzyjające warunki rozwoju.

Spośród grzybów wyosobnionych z gleb ogrodniczych oraz szczepów grzybów pochodzących z zakładowej kolekcji (łącznie 190 szczepów) wybrano do badań nad wytwarzaniem ksylanazy 88 szczepów charakteryzujących się dobrym i szybkim wzrostem na podłożu z dodatkiem zmielonej słomy. Ponieważ wzrost na tak skomplikowanym substracie, jak słoma, mógł dawać tylko powody do przypuszczeń, że szczepy te wytwarzają takie enzymy, jak ksylanazy, celulazy bądź pektynazy, przebadano aktywność ksylanolityczną na czystym substracie — ksylanie, aby stwierdzić, iż szczepy te rzeczywiście syntetyzowały pozakomórkowe enzymy ksylanolityczne. Grzybnie pochodzące z hodowli zawierającej zmieloną słomę stanowiły inoculum do tych badań. Wyniki oznaczeń aktywności enzymatycznej metodą dyfuzji podano na ryc. 1—4. Stwierdzono, że ok. 22% badanych szczepów nie wytwarzało pozakomórkowych enzymów ksylanolitycznych (nie dawały stref rozjaśnienia wokół krążka grzybni). Były to głównie szczepy należące do rodzajów *Mucor* i *Rhizopus*. 20% wytwarzało niewielkie strefy rozjaśnienia (0,74—1,58 mg rozłożonego ksylanu), a 58%

Tab. 1. Aktywność ksylanolityczna szczepów z rodzaju *Aspergillus* po 10 dniach hodowli w temp. 28°C
Xylanase activity of *Aspergillus* strains after 10 days of growth at 28°C

L.p.	Szczep Strain	Czas trwania hydrolizy w godz. Time of enzymic hydrolysis hours		
		24	48	72
		Ilość cukrów redukujących mg/ml płynu pohodowlanego Amount of reducing sugars mg/ml culture filtrate		
1.	*Aspergillus niger* 13/1	1,17	2,13	2,61
2.	*Aspergillus oryzae* 13/5	3,14	3,51	3,62
3.	*Aspergillus oryzae* 13/8	2,94	3,85	4,37
4.	*Aspergillus flavus* 13/9	1,17	2,43	3,05
5.	*Aspergillus wentii* 13/15	5,42	6,03	6,86
6.	*Aspergillus* sp. B-2	3,77	4,08	4,15
7.	*Aspergillus* sp. C-3	3,73	4,54	4,93
8.	*Aspergillus* sp. E-11	1,01	2,88	3,41
9.	*Aspergillus* sp. G-5	3,99	4,95	6,42
10.	*Aspergillus* sp. G-15	0,29	1,25	2,18
11.	*Aspergillus* sp. G-16	2,14	4,05	4,21
12.	*Aspergillus* sp. G-18	1,27	2,55	2,83
13.	*Aspergillus* sp. G-19	3,59	4,96	5,68
14.	*Aspergillus* sp. G-26	1,18	3,85	5,40
15.	*Aspergillus* sp. G-27	1,48	4,63	6,15
16.	*Aspergillus* sp. G-31	2,43	5,28	5,95
17.	*Aspergillus* sp. H-2	5,08	6,62	7,33
18.	*Aspergillus* sp. H-3	1,72	3,03	3,67
19.	*Aspergillus* sp. H-15	2,82	5,15	5,92

Hodowle prowadzono na pożywce Saundersa+2% zmielonej słomy, *pH* — 5,5 (przed sterylizacją).

Mineral Saunders medium+2% of powdered straw were used for cultivation of the tested strains, pH — 5.5 (before sterilization).

Tab. 2. Aktywność ksylanolityczna szczepów grzybów z rodzaju *Fusarium* po 10 dniach hodowli w temp. 28°C
Xylanase activity of *Fusarium* strains after 10 days of growth at 28°C

L.p.	Szczep Strain	Czas trwania hydrolizy w godz. Time of enzymic hydrolysis hours		
		24	48	72
		Ilość cukrów redukujących mg/ml płynu pohodowlanego Amount of reducing sugars mg/ml culture filtrate		
1.	*Fusarium* sp. 25/1	3,45	3,87	5,18
2.	*Fusarium* sp. 25/2	1,55	2,40	2,93
3.	*Fusarium* sp. 25/3	0,36	1,48	1,95
4.	*Fusarium culmorum* 25/5	2,14	3,86	3,85
5.	*Fusarium oxysporum* 25/9	2,33	4,18	4,27
6.	*Fusarium bulbigenum* 25/10	3,86	4,67	4,96
7.	*Fusarium* sp. A-5	0,54	1,09	1,25
8.	*Fusarium* sp. A-8	0,67	1,17	1,84
9.	*Fusarium* sp. E-15	4,36	5,02	5,77
10.	*Fusarium* sp. E-17	3,05	4,20	4,60
11.	*Fusarium* sp. G-12	1,73	3,30	4,40
12.	*Fusarium* sp. G-22	2,21	3,28	3,87
13.	*Fusarium* sp. G-24	2,14	3,18	3,61
14.	*Fusarium* sp. G-29	3,10	4,58	4,51

Hodowle prowadzono na pożywce Saundersa+2% zmielonej słomy, *pH* — 5,5 (przed sterylizacją).
Mineral Saunders medium+2% of powdered straw were used for cultivation of the tested strains, pH — 5.5 (before sterilization).

szczepów tworzyło strefy rozjaśnienia o średnicy ponad 3,0 mm (1,69—4,91 mg rozłożonego ksylanu). Te ostatnie można uznać jako aktywne w biosyntezie ksylanazy.

Podobną metodę selekcji stosowali i inni autorzy (15, 16), badając aktywność ksylanolityczną i pektynolityczną grzybów, promieniowców i bakterii wyosobnionych z gleby. Spośród przebadanych szczepów drobnoustrojów przez radzieckich badaczy 88% szczepów grzybów, 64% szczepów promieniowców i 19% szczepów bakterii wytwarzało enzymy ksylanolityczne. Najaktywniejsze szczepy należały do rodzajów *Aspergillus* i *Trichoderma*, podobnie jak i w moich badaniach.

Najaktywniejsze szczepy z przebadanych należały do grupy szczepów wyosobnionych z gleb ogrodniczych (oprócz szczepu *Aspergillus wentii* 13/15). Podobne wyniki otrzymali również japońscy uczeni: Iizuka i Kawaminami (7) badając aktywność ksylanolityczną szczepów promieniowców świeżo wyizolowanych z gleby i szczepów pochodzących z kolekcji muzealnej. Jedną z przyczyn różnic aktywności ksylanolitycznej mogło być przechowywanie szczepów muzealnych przez dłuższy okres na pożywce pozbawionej substancji organicznych typu hemiceluloz.

Tab. 3. Aktywność ksylanolityczna szczepów grzybów z rodzaju *Trichoderma* i *Trichothecium* po 10 dniach hodowli w temp. 28°C
Xylanase activity of the *Trichoderma* and *Trichothecium* strains after 10 days of growth at 28°C

L.p.	Szczep Strain	Czas trwania hydrolizy w godz. Time of enzymic hydrolysis hours		
		24	48	72
		Ilość cukrów redukujących mg/ml płynu pohodowlanego Amount of reducing sugars mg/ml culture filtrate		
1.	*Trichoderma* sp. 18/2	1,13	2,31	4,52
2.	*Trichoderma viride* 18/4	3,27	5,08	5,08
3.	*Trichoderma album* 18/7	2,33	3,10	3,34
4.	*Trichoderma* sp. D-6	2,88	3,43	3,77
5.	*Trichoderma* sp. E-3	1,95	2,67	3,03
6.	*Trichoderma* sp. E-4	3,84	3,95	4,05
7.	*Trichoderma* sp. E-5	1,09	3,03	3,28
8.	*Trichoderma* sp. E-9	0,94	2,05	3,12
9.	*Trichoderma* sp. F-14	2,27	3,27	3,65
10.	*Trichoderma* sp. G-1	4,15	5,47	5,85
11.	*Trichoderma* sp. G-10	0,96	3,53	3,25
12.	*Trichoderma* sp. G-20	1,76	3,42	4,33
13.	*Trichoderma* sp. G-25	1,25	3,85	5,72
14.	*Trichoderma* sp. H-11	1,03	4,16	5,13
15.	*Trichothecium roseum* 10/6	2,05	4,05	4,56
16.	*Trichothecium roseum* 10/11	2,94	3,68	4,68
17.	nie oznaczony E-14 (not designated)	1,35	2,77	3,24
18.	nie oznaczony G-4 (not designated)	1,04	2,53	3,63

Hodowle prowadzono na pożywce Saundersa+2% zmielonej słomy, *pH* — 5,5 (przed sterylizacją).
Mineral Saunders medium+2% of powdered straw were used for cultivation of the tested strains, pH — 5.5 (before sterilization).

Do hodowli na podłożu płynnym wybrano 51 najaktywniejszych szczepów wyselekcjonowanych z poprzedniej serii doświadczeń. W tych hodowlach zastosowano sproszkowaną słomę pszenną jako jedyne źródło węgla, ponieważ liczni autorzy podali, że użycie resztek roślinnych, jak np. zmielona słoma, kaczany kukurydziane, łuski słonecznikowe lub odpady przemysłu młynarskiego (łuski różnego rodzaju zbóż), dawało dobre wyniki w biosyntezie hemicelulaz (10, 13, 14). Wyniki oznaczeń aktywności ksylanolitycznej płynów pohodowlanych badanych szczepów zebrano w tab. 1—3. Wszystkie przebadane szczepy syntetyzowały pozakomórkowe enzymy ksylanolityczne na podłożach płynnych. Najaktywniejsze należały do rodzajów *Aspergillus*, *Trichoderma* i *Fusarium*.

Najaktywniejsze szczepy. w biosyntezie ksylanaz wymagają dalszych szczegółowych badań, mających na celu określenie optymalnego składu podłoża dla syntezy tych enzymów i optymalnych warunków hodowli.

PIŚMIENNICTWO

1. Barnett H. L.: Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company. Minneapolis 1962.
2. Czaplińska S.: Studia nad chorobami lucerny powodowanymi przez grzyby. II. Badania mikroflory siedlisk lucerny w 1, 2, 3 roku użytkowania ze szczególnym uwzględnieniem gatunków antagonistycznych. Acta Mycolog. 9 (1), 23—51 (1973).
3. Domsch K., Gams W.: Variability and Potential of Soil Fungus Population to Decompose Pectin, Xylan, Carboxymethylcellulose. Soil Biology and Biochem. **1** (1), 29—36 (1969).
4. Gilman C. J.: A Manual of Soil Fungi. The Iowa State College Press-Ames, Iowa USA, 1957.
5. Gjertsen P.: Carbohydrates Composition of Wort and Beer. J. Inst. Brew. **56**, 296 (1953).
6. Hampel B., Szajer Cz.: Estimation of the Cellulolytic Activity of Soil Fungi with Agar-Plate Technique. Polish J. Soil Sci. **1** (2), 137—146 (1968).
7. Iizuka H., Kawaminami T.: Studies on Xylanase from Microorganisms. II. Isolation and Selection of Xylanase Producing Microorganisms and Identification of a New Species of Streptomyces. Agr. Biol. Chem. **33** (9), 1257—1263 (1969).
8. Jermyn M. A., Isherwood F. A.: Changes in the Cell Wall of the Pear during Ripening. Biochem. J. **64**, 1, 123—132 (1956).
9. Martin J. P.: Use of Acid, Rose Bengal and Streptomycin in the Plate Method for Estimating Soil Fungi. Soil Science **69**, 215—232 (1950).
10. Salmanowa L. S., Bukanowa W. I.: Optimalnoje usłowije kultiwirowanija griba *Tr. roseum* s celju połuczenija cytoliticzeskich fiermientow. Fiermient. Spir. Promyszl. **5**, 22—25 (1964).
11. Saunders P. R., Siu R. G. H., Genest R. N.: A Cellulolytic Preparation from *Myrothecium verrucaria*. J. Biol. Chem. **174**, 697—703 (1948).
12. Sørensen H.: Microbial Decomposition of the Xylan. Uppsala Almqvist-Wiksells Boktryckeri AB 1957.
13. Sumizu K., Masaka Y., Tanaka S.: Studies on Xylanase of *Pricularia oryzae*. J. Bioch. (Tokyo) **50** (5), 538—543 (1961).
14. Taszpułatow Z., Tieslinowa N. A.: Biosintiez celluloliticzeskich fiermientow *Trichoderma lignorum* w zawisimosti ot usłowij kultiwirowanija. Mikrobioł. **43** (4), 609—612 (1974).
15. Tiunowa N. A. i współprac.: Gidroliticzeskije fiermienty actinomycetow. Prikł. Bioch. Mikrobioł. **7** (4), 456—461 (1971).
16. Tiunowa N. A., Kobzewa N. J., Feniksowa R. W.: Niekotoryje wniekletocznyje gidroliticzeskije fiermienty gribow i baktierij. Prikł. Bioch. Mikrobioł. **9** (2), 198—202 (1973).
17. Toussoun A. A., Nelson P. E.: A Pictoral Guide to the Identification of *Fusarium Species*. The Pennsylwania State University Press **8** (1968).
18. Whistler R. L., Bachrach J., Bowman D. R.: Preparation and Properties of Corn Cob Holocellulose. Arch. Bioch. **19**, 23—33 (1948).
19. Whistler R. L., Gaillare B. D. E.: Comparison of Xylans from Several Annual Plants. Arch. Bioch. Bioph. **93**, 332—334 (1961).
20. Ziemięcka J.: Rozkład pentozanów przez mikroorganizmy gleby. Roczn. Nauk Roln. i Leśn. **25**, 313—329 (1931).

РЕЗЮМЕ

Целью работы были поиски штаммов грибов, активно участвующих в разложении ксилана. Из 190 охваченных исследованиями штаммов грибов 108 были изолированы из садовых почв, 82 взяты из музейной коллекции.

Установлено, что внеклеточные ксиланолитические энзимы производят около 30% всех штаммов. Наиболее активными были штаммы родов *Aspergillus, Trichoderma, Fusarium*, принадлежащие в основном к группе штаммов, изолированных из садовых почв.

SUMMARY

The work aimed at obtaining active fungi strains during the decomposition of xylane. The investigations comprised 190 fungi strains isolated from garden soils (108) and those obtained from museum collection (82).

It was found that ca 30% of the examined strains produced extracellular xylanase enzymes. The most active among them belonged to the three genera: *Aspergillus, Trichoderma* and *Fusarium* and were mainly isolated from garden soils.