

BIOSINTEZA CELULAZA PLIJESNI
PENICILLIUM FUNICULOSUM 515 NA
POVRŠINI OTPADNIH CELULOZNIH
SUPSTRATA

With Summary in English

ANTEA KORČULANIN, IVKA BIOČIĆ i ZLATA JURIĆ
(Tehnološki fakultet Zagreb i Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek)

Primljeno 2. 12. 1976.

Uvod

Celuloza je organska tvar koja se svake godine obnavlja u velikim količinama. Unatoč izobilju proizvedene celuloze — prema nekim procjenama biljke proizvedu 10^{11} t godišnje (Mandels et al. 1972) — tek se manji dio iskorištava u industrijskoj preradi. Velike količine celuloznih otpadaka svakodnevno se nakupljaju i ostaju neiskorištene, a u mnogo slučajeva zagađuju čovjekovu okolinu. Međutim su mogućnosti iskorištavanja celuloznih tvari nakon hidrolize celuloze velike. Dobiveni šećerni hidrolizati imaju mnogostruku primjenu u ljudskoj i stočnoj prehrani: kao podloge za uzgoj mikroorganizama i proizvodnju jednostaničnih proteina i kao ishodne sirovine za različite fermentacijske procese.

Enzimaska hidroliza celuloze ima znatne prednosti pred hidrolizom s pomoću kiselina. Zato se posljednjih 10—15 godina intenzivno proučavaju mikroorganizmi — proizvođači celulolitičkih enzima. Najviše je objavljenih radova o mikrobnjoj proizvodnji celulaza različitih rodova plijesni, posebno *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Aspergillus*, *Penicillium* i *Stachybotrys* (Loginova i Tašpulatov 1965, Korčulanin et al. 1968, Mandels et al. 1971, Samardžić et al. 1971, Cimerman et al. 1976). Objavljeno je mnogo podataka o parametrima uzgoja ovih plijesni, kao i o djelovanju pojedinih komponenata njihovog celulaznog kompleksa. Tako su King i Vessal (1969) dali podjelu enzimskog sistema plijesni *T. viride* koja je općenito prihvaćena. Prema tim autorima celulazni enzimski kompleks sastoji se iz:

1) C₁-enzima koji je neophodan da bi započela hidroliza kristalinične celuloze;

2) egzo- i endo-β-1,4-glukanaza koje hidroliziraju veze od nereducirajućih krajeva odnosno u sredini celulozne molekule (C_x-enzim);

3) β-glukozidaze koja hidrolizira celobiozu (celobiaz).

Takvu podjelu enzimskih komponenti celulaznog sistema plijesni *T. viride* prihvaćaju Brandt et al. (1972), Howell and Stuck (1975) i Mandels et al. (1975).

U ovom radu prikazani su rezultati ispitivanja nekih parametara koji utječu na sintezu celulaza plijesni *Penicillium funiculosum* 515 uzgojenih na površini otpadnih celuloznih materijala iz poljoprivrede. U prethodnim radovima (Jurić et al. 1976a, 1976b) odabrane su najaktivnije plijesni od većeg broja izoliranih iz prirodnih nalazišta i ispitani su uvjeti submerznog uzgoja, posebno utjecaj usitnjavanja supstrata, utjecaj pH podloge i pojedinih induktora na sintezu celulaza.

Materijal i metode rada

Za pokuse je odabrana plijesan *P. funiculosum* 515 iz Zbirke mikroorganizama Tehnološkog fakulteta u Zagrebu, koja je čuvana na kosoj sladovini. Kao inokulum upotrijebljene su konidije izrasle na sladnom agaru ili na vlažnim pšeničnim mekinjama ili pak micelijski inokulum uzgojen 48 sati submerzno na rotacijskoj tresilici s 280 o/min pri temperaturi 28 °C.

S 30% (v/t) inokuluma naciepljene su samljevene i navlažene podloge u Petrijevim zdjelicama (promjera 18 cm). Podloge su bile pšenične mekinje, pšenična slama, kukuruzovina ili kukuruzni oklasci. Osnovni sastojci ovih podloga prikazani su u tabeli 1. Podloge su navlažene vodonom vodom ili vodom s otopinama soli sastavljene prema Hutchin-sonu i Claytonu (Imšeneckij 1953) ili prema Reese et al. (1950). Sastav otopina dan je u tabeli 2.

Podloge su navlažene s optimalnim postotkom vode, koji je ustanovljen za svaku podlogu posebno: pšenične mekinje 65%, pšenična slama 75%, kukuruzovina i kukuruzni oklasci 70%.

Sinteza celulaza praćena je tokom 7—9 dana uzgoja. Svaki dan su uzorci osušeni, a zatim uz miješanje ekstrahirani vodom 1 sat pri temperaturi 50 °C. Nakon toga ekstrakti su profiltrirani i u filtratu je određena celulolitička aktivnost.

Aktivnost celulolitičkog kompleksa određena je praćenjem razgradnje:

a) karboksimetilceluloze (C. komponenta) djelovanjem 1 ml enzimskog filtrata na 8 ml 1%-tne otopine karboksimetilceluloze 40 min pri 45 °C i 2 ml pufera pH 4,8 (modificirana metoda po Verhovcvoj, 1965).

b) pamuka (C. komponenta) — djelovanjem 1 ml enzimskog filtrata na 50 mg pamuka 24 sata pri 50 °C, 1 ml pufera pH 4,8 (Mandels and Weber 1969),

c) filter papira (F.P.-aktivnost) — djelovanjem 1 ml enzimskog filtrata na 50 mg filter papira Whatman No 1, 1 sat pri 50 °C i pH 4,8 (Mandels and Weber 1969).

Nastali šećeri određeni su prema metodi Somogyija i Nelsona (Nelson 1944), a izraženi su kao mg glukoze na g suhog uzorka — preparata.

Tabela 1 — Osnovni sastojci podloga
 Table 1 — Basic components of the media

Podloga — Medium	Sastav (% suhe tvari) — Contain (% dry wt.)						B.E.T.*	E.N.S.
	Voda	Proteini	Celuloza	Masti	Pepeco	Ash		
Substrate	Water	Proteins	Cellulose	Fats	Ash			
Pšenične mekinje Wheat bran	11,60	12,97	12,82	3,97	5,47		53,17	
Pšenična slama Wheat straw	8,15	4,78	49,73	2,71	3,42		31,21	
Kukuruzovina Corn stems	13,20	5,74	43,75	3,17	6,80		37,34	
Kukuruzni oklasci Corn cobs	8,60	5,41	51,04	2,97	3,74		26,24	

*bezdušične ekstraktivne tvari
 extractable nitrogenless substances

Tabela 2 – Sastav otopina soli

Table 2 – Contain salts solutions

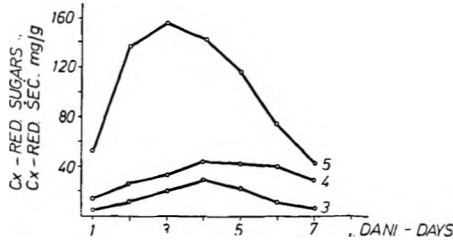
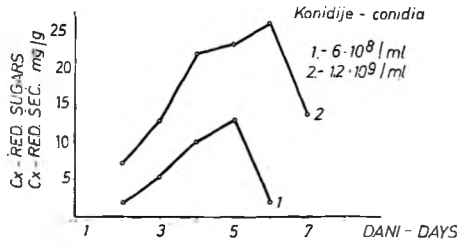
HUTCHINSON AND CLAYTON		REESE, SIU AND LEVINSON	
KH_2PO_4	1,0 g	KH_2PO_4	2,0 g
CaCl_2	0,1 g	CaCl_2	0,3 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g
NaNO_3	2,5 g	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4 g
FeCl_3	0,01 g	Urea	0,3 g
NaCl	0,1 g	Otopina elemenata u tragovima (Trace elements solution)	1,0 ml
Dest. vode do (Dest. water to)	1,0 l	Dest. voda do (Dest. water to)	1,0 l
		Otopina elemenata u tragovima (Trace elements solution)	
		$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,56 g
		$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,00 g
		ZnCl_2	1,67 g
		CoCl_2	2,00 g
		Dest. voda do (Dest. water to)	1,0 l

Rezultati i tumačenja

Da bi se ustanovilo da li priprema inokuluma utječe na sintezu celulaza ispitivane plijesni, inokulum je priređen na 4 načina: konidije uzgojene na sladnom agaru, konidije uzgojene na vlažnim pšeničnim mekinjama, micelijski inokulum uzgojen submerzno u podlozi sa solima (Reese et al. 1950) i micelijski inokulum uzgojen submerzno u podlozi sa solima uz dodatak 0,5% peptona, 0,1% Tweena 80 (Mandels et al. 1975) i 1% celuloznog supstrata.

Iz grafikona (sl. 1) vidi se da su najmanje vrijednosti celulolitičke aktivnosti dobivene pri inokuliranju konidijama, a najveća aktivnost je nakon 5–6 dana uzgoja. U primjeni micelijskog inokuluma uzgojenog u podlozi sa solima uz dodatak 0,5% peptona, 0,1% Tweena 80 i 1% celuloznog supstrata kao induktora sinteze celulaza dobivene su najveće vrijednosti celulolitičke aktivnosti i maksimalna sinteza je nakon 3 dana uzgoja. Povoljno djelovanje dodatka peptona podlozi za uzgoj na sintezu celulaza ustanovili su Mandels i sur. (1975), djelovanje Tweena 80 i drugih sredstava koja smanjuju napetost površine ispitali su Reese i Maguire (1971). No ti autori nisu ispitivali utjecaj tih dodataka podlozi za uzgoj inokuluma. Naši pokusi su pokazali da priprema inokuluma utječe na celulolitičku aktivnost i na skraćanje vremena postizanja maksimalne aktivnosti. Ako se upotrijebi micelijski inokulum uzgojen u podlozi s dodacima peptona, Tweena 80 i celuloznog supstrata, dobivaju se veće vrijednosti i skraćuje vrijeme postizanja maksimalne aktivnosti.

Dodatak otopine soli vodi za vlaženje celuloznih supstrata znatno utječe na sintezu celulaza.



Sl. 1. Utjecaj pripreme inokuluma na sintezu celuloza plijesni *P. funiculosum* 515

3. konidije s vlažnih pšeničnih mekinja
4. micelijski inokulum; podloga Reese et al.
5. micelijski inokulum; podloga Reese et al. + 0,5% petpona + 1% Tween 80 + 1% pšen. mekinje.

Fig. 1. Effect of inoculum preparation on synthesis of cellulases by *P. funiculosum* 515

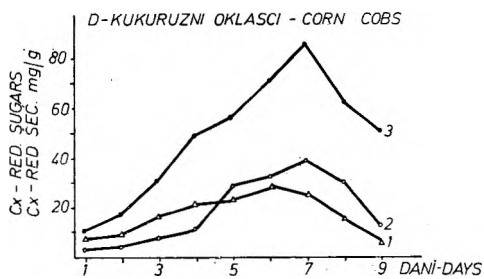
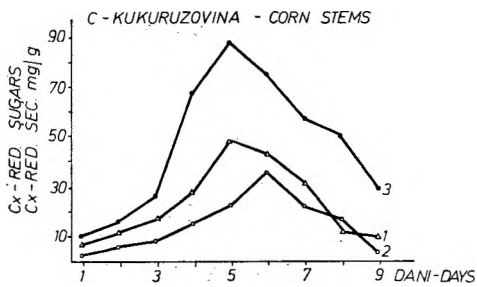
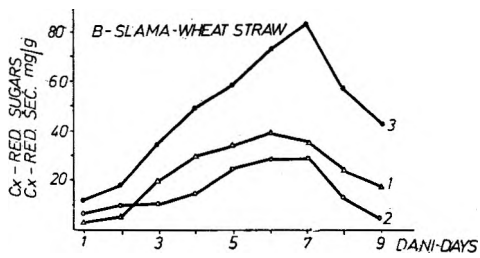
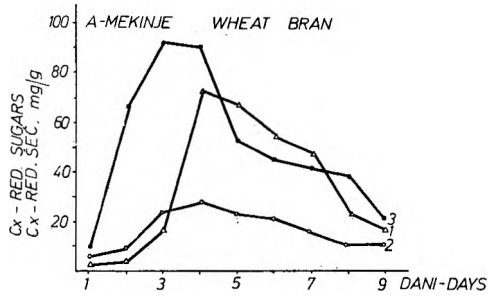
3. conidia from moistened wheat bran
4. mycelial inoculum; medium according to Reese et al.
5. mycelial inoculum; medium according to Reese et al. + 0.5% peptone + 0.1% Tween 80 + 1% wheat bran.

Sl. 2. Sinteza celuloza plijesni *P. funiculosum* 515 tokom uzgoja na pšeničnim mekinjama (A), pšeničnoj slami (B), kukuruzovini (C) i kukuruznim oklascima (D) ovisno o vlaženju podloge

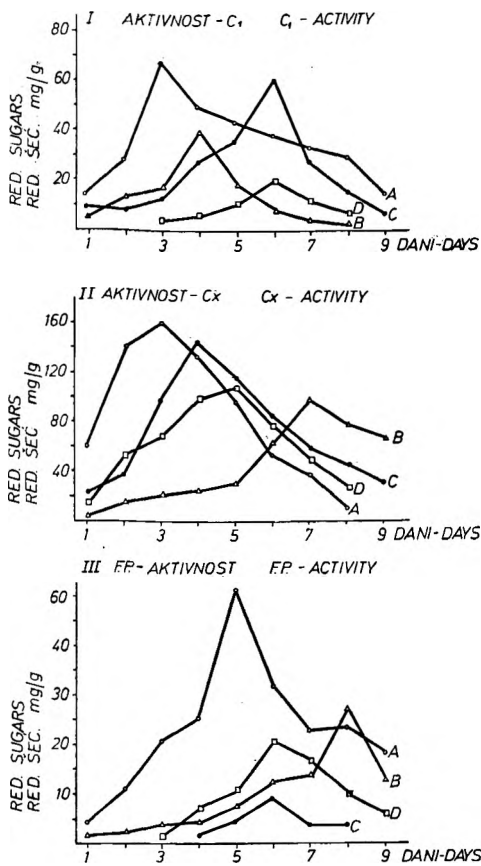
1. vodovodna voda
2. otopina soli (Hutchinson and Clayton)
3. otopina soli (Reese et al.).

Fig. 2. Cellulases synthesis during the cultivation of *P. funiculosum* 515 on wheat bran (A), wheat straw (B), corn stems (C) and corn cobs (D) depending on moistening of medium

1. tap water
2. salts solution (Hutchinson and Clayton)
3. salts solution (Reese et al.).



Sl. 2. — Fig. 2.



Sl. 3. Komponente celulozitičkog kompleksa plijesni *P. funiculosum* 515 uzgojenih na pšeničnim mekinjama (A), pšeničnoj slami (B), kukuruzovini (C) i kukuruznim oklascima (D).

Fig. 3. Cellulolytic complex components of *P. funiculosum* 515 grown on wheat bran (A), wheat straw (B), corn stems (C) and corn cobs (D).

Dodatak otopine soli (prema Reese i sur. 1950) vodi za vlaženje podloga daje najbolje rezultate (sl. 2, krivulje 3). Vrijeme postizanja maksimalne celulolitičke aktivnosti na pojedinim podlogama je različito: na pšeničnim mekinjama je treći dan, na kukuruzovini peti dan, a na slami i kukuruznim oklascima — sedmi. Iz tih pokusa se vidi da je i pored kompleksnog sastava ovih podloga potrebno dodavati različite soli da bi se postigla optimalna sinteza celulaza.

Da bi se ispitalo da li enzimski filtrati sadržavaju C_1 i C_x komponente celulolitičkog kompleksa, kao supstrat hidrolize upotrijebljen je pamuk i karboksimetilceluloza, a ispitana je također hidroliza filter-papira, što se često upotrebljava jer daje sliku ukupne aktivnosti celulaza (sl. 3).

Celulolitički filtrati su dobiveni uzgojem plijesni na sve 4 podloge.

Rezultati pokusa su pokazali da enzimski filtrati sadržavaju C_1 i C_x komponentu. Vrijednosti celulolitičke aktivnosti su različite na pojedinim podlogama, a također i vrijeme postizanja maksimalne aktivnosti. C_1 aktivnost doseže maksimum između 3. i 6. dana, C_x između 3. i 7. dana, a F.P. aktivnost od 5. do 8. dana ovisno o podlozi za uzgoj plijesni.

Zaključci

Priprema inokuluma utječe na sintezu celulaza. Najveća celulolitička aktivnost se postiže kad se upotrijebi micelijski inokulum uzgojen submerzno u podlozi prema Reese i sur. (1950) uz dodatak 0,5% peptona, 0,1% Tweena 80 i 1% celuloznog supstrata na kojem će se plijesni uzgajati. U poredbi s konidijama primjena micelijskog inokuluma skraćuje vrijeme postizanja maksimalne sinteze celulaza.

Pokusi vlaženja supstrata vodovodnom vodom, otopinama soli prema Hutchinsonu i Claytonu i prema Reese i sur. pokazuju da se najbolja sinteza celulaza postiže uzgojem plijesni na podlogama vlaženim otopinom soli prema Reese i sur. (1950).

Na svim ispitivanim podlogama *Penicillium funiculosum* 515 sintetizira C_1 i C_x komponentu celuloznog kompleksa. Ovisno o podlozi dobivene su različite vrijednosti celulolitičke aktivnosti i različito je vrijeme postizavanja maksimalne sinteze pojedinih komponenata.

Literatura

- Brandt, D., L. Hontz, M. Mandels, 1972: Engineering aspects of the enzymatic conversion of waste cellulose to glucose. Proc. AIChE meeting.
- Čimerman, A., A. Perdiš, S. Škafar, 1976: Proučavanje rasta i aktivnosti celulolitskih gljiva na nekim industrijskim otpacima. Acta Biol. Iug., Mikrobiologija, 13, 25—32.
- Howell, J. A., J. D. Stuck, 1975: Kinetics of Solca Flocc cellulose hydrolysis by *Trichoderma viride* cellulase. Biotechnol. Bioeng. 17, 873—893.
- Imšeneckij, A. A., 1953: Mikrobiologija cellulozi. AN SSSR Moskva.
- Jurić, Z., A. Korčulanin, H. Matanić, O. Pospišil, 1976a: Komparativna ispitivanja aktivnosti celulaza plijesni *Trichoderma viride* 1253 i *Penicillium rugulosum* 514. Acta Biol. Iug., Mikrobiologija, 13, 25—32.
- Jurić, Z., A. Korčulanin, H. Matanić, O. Pospišil, 1976b: Utjecaj celuloznih supstrata u podlozi na aktivnost celulaza plijesni *Trichoderma viride* 1253 i *Penicillium funiculosum* 515. Acta Biol. Iug., Mikrobiologija, 13, 33—41.

- King, K. W., M. I. Vessal, 1969: Advan. Chem. Ser., 95, 7.
- Korčulanin, A., D. Hršak, V. Johanides, 1968: Proizvodnja i svojstva celulaza plijesni *Aspergillus niger* 439. Acta Biol. Iug., Mikrobiologija, 5, 163—169.
- Loginova, L. G., Ž. Tašpulatov, 1965: Termofiljnij grib *Aspergillus fumigatus* obrazujušće aktivnie cellulolitičeskie fermenti. Mikrobiologija (SSSR), 34, 258—264.
- Mandels, M. et al., 1972: Disposal of cellulosic waste material by enzymatic hydrolysis. Saopćenje na Army Science Conference West-Point, NY. 1972. Citat: Pathak, A. N and T. K. Ghose (1973). Proc. Biochem., 8, 35—38.
- Mandels, M., D. Sternberg, E. R. Andreotti, 1975: Growth and cellulase production by *Trichoderma viride*. Symp. on enzymatic hydrolysis of cellulase. Aulanko, Finland 12—14 March.
- Mandels, M., J. Weber, 1969: The production of cellulases. Adv. Chem. Ser., 95, 391—414.
- Mandels, M., J. Weber, R. Parizek, 1971: Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*. Appl. Microbiol., 21, 152—154.
- Nelson, N., 1944: A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153, 375—380.
- Reese, E. T., A. Maguire, 1971: Increase in cellulase yields by addition of surfactants to cellobiose cultures of *Trichoderma viride*. In "Dev. Ind. Microbiol.", 12, 212. Amer. Inst. Biol. Sc. Washington D. C.
- Reese, E. T., R. G. H. Siu, H. S. Levinson, 1950: The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. J. Bact., 59, 485—497.
- Samardžić, D., Z. Jurić, V. Johanides, 1971: Produkcija celulolitičkih enzima kod plijesni *Stachybotrys atra* 1223. Acta Biol. Iug., Mikrobiologija, 8, 241—248.

SUMMARY

BIOSYNTHESIS OF *PENICILLIUM FUNICULOSUM* 515 CELLULASES ON CELLULOSIC WASTES

Antea Korčulanin, Ivka Biočić and Zlata Jurić

(Faculty of Technology, Zagreb and Faculty of Food Technology, Osijek)

Surface — culture conditions affecting the biosynthesis of cellulolytic enzymes by *Penicillium funiculosum* 515 on different agricultural wastes such as wheat bran, wheat straw, corn stems and corn cobs were investigated.

P. funiculosum 515 was cultivated on moistened milled substrates. Every day for 7 to 9 days of cultivation the samples were taken, extracted with water and then filtered. Cellulolytic activity of the filtrates obtained was determined on cotton, filter paper (Mandels and Weber 1969) and carboxymethylcellulose (Verhovcva 1965). The sugars produced were measured according to Somogyi (Nelson 1944).

Conditions for preparing inoculum were evaluated: the use of the conidia grown on malt agar or wheat bran, the use of mycelial inoculum and media composition for inocula cultivation. The highest cellulase

yield was achieved when mycelia grown in media containing salts according to Reese et al. (1950), 0.5% peptone, 0.1% Tween 80 (Mandels et al. 1975) and 1% cellulosic substrate were used as inocula.

The salts composition used along with water for moistening media were examined and it was found that the composition according to Reese et al. (1950) was the optimal one.

Depending on basic substrate in media the different ratio and degrees of cellulolytic activities of single components were obtained. The maximum time for every single component synthesis of cellulase complex depended on the composition of cultivation media.

P. funiculosum 515 was able to grow on all tested cellulosic wastes and to produce cellulolytic enzymes as well.

Prof. dr Antea Korčulanin
Prof. dr Zlata Jurić
OOUR — Institut za prehrambeno i
biokemijsko inženjerstvo
Tehnološki fakultet
Pierottijeva 6
Yu 41001 Zagreb (Jugoslavija)

Ivka Biočić, dipl. inž.
asistent
Prehrambeno-tehnološki fakultet
Yu 54000 Osijek (Jugoslavija)