

## Štúdium vplyvu tenzidov a substrátu na produkciu celuláz hubou *Trichoderma viride* HV 4

VALTER VOLLEK — IVANA KOČALKOVÁ — BOHUMIL ŠKÁRKA

**Súhrn.** V práci sa sledoval vplyv substrátu a rozličných tenzidov na produkciu celuláz hubou *Trichoderma viride* HV 4. Najvyššia produkcia celuláz sa dosiahla prídavkom zmesi tenzidov s melasou do základného média, ktoré obsahovalo 1 % mikrokryštalickej celulózy. Okrem Tweenu 80 sa z použitých tenzidov osvedčili aj výrobky domácej produkcie, a to Slovanik NT 70 a Slovanik Pv 370/b.

Celulázy predstavujú systém enzýmov, ktoré postupne degradujú nerozpustnú celulózu na celobiózu, oligosacharidy až na konečný produkt enzymovej hydrolýzy — glukózu. Celulóza sa stala stredobodom pozornosti biochemikov a technologov, lebo je perspektívnou surovinou na získanie nových zdrojov krmovín, vysokohodnotných bielkovín, prípadne aj potravín.

Celulázy tvoria komplex synergicky pôsobiacich enzýmov [1]. Bežnými analytickými metódami možno v celulolytickom systéme rozlíšiť tri druhy aktivít:

1. Exo- $\beta$ -1,4-glukanázy, označované ako komponent  $C_1$ , spôsobujú hydrolýzu nerozpustnej natívnej celulózy v jej amorfných oblastiach. Odštepujú glukózo-  
vé alebo celobiózové jednotky náhodne z neredukujúcich ukončení reťazca [2].

2. Endo- $\beta$ -1,4-glukanázy atakujú vnútorné glukozidické väzby v  $\beta$ -1,4-glukáne, a to v miestach s nižšou usporiadanosťou vlákien. Spolu s exoglukanázami predstavujú enzým označovaný ako komponent  $C_x$  [3]. Výsledkom ich pôsobenia je zmes glukózy a celobiózy.

3.  $\beta$ -glukozidázy hydrolyzujú celobiózu a krátke reťazce celooligosacharidov na glukózu.

V prírode je veľa mikroorganizmov, ktoré produkujú celulázy; z nich najproduktívnejšie a najviac študované sú najmä druhy *Trichoderma viride* a *T. reesei*.

RNDr. Valter Vollek, Ing. Ivana Kočalková, doc. Ing. Bohumil Škárka, CSc.,  
Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, Chemickotechnologická fakulta SVŠT,  
Jánska 1, 812 37 Bratislava.

Produkcia celulózy in vitro je silne ovplyvnená zložením kultivačného média a podmienkami kultivácie [4]. Najvýhodnejším zdrojom uhlíka je celulóza. Dôležitý pre tvorbu celulózy je aj vhodný zdroj dusíka, fosforu, prítomnosť niektorých mikroelementov, vitamínov a určitá koncentrácia povrchovo aktívnej látky (tenzidu), ktorá svojím zmäčacím účinkom zlepšuje kontakt medzi nerozpustnou celulózou a mikroorganizmom. Všetky tensidy však nepôsobia na syntézu exoenzymov priaznivo. Zistilo sa, že aniónové tensidy, ktoré sú reaktívnejšie ako neiónové, pôsobia negatívne, ba až deštruktívne na bunkové steny. Neiónové tensidy môžu pôsobiť na rast mikroorganizmov negatívne vtedy, ak majú v molekule látku s antimikrobiálnym účinkom, napr. fenol pri Slovafolech [5].

Cieľom tejto práce bolo zistiť vplyv rozličných tensidov na tvorbu celulózy a nájsť čo najoptimálnejšie zloženie kultivačného média pre rast a produkciu celulózy študovanej huby *Trichoderma viride* HV 4.

### Materiál a metódy

**Použitá kultúra.** V pokusoch sme použili kultúru *Trichoderma viride*, kmeň HV 4 zo zbierky mikroorganizmov Katedry technickej mikrobiológie a biochémie Chemickotechnologickej fakulty SVŠT v Bratislave. Kultúra bola pôvodne izolovaná z lesnej pôdy a je udržiavaná na šikmom sladínovom agare pri teplote 4 °C.

**Kultivačné médiá.** Na kultiváciu študovanej huby sme použili Mandelsovej médium tohto zloženia:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1,4 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2,0 g), močovina (0,3 g)  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (0,3 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (0,3 g), peptón (1,0 g), kvasničný extrakt (0,1 g), celulóza (10,0 g), voda (vodovodná) (1,0 l), pH 4,9—5,0.

Sterilizácia: 120 kPa 20 min.

Toto médium označujeme ako médium 1. K tomuto základnému médiu sme v jednotlivých pokusoch pridávali: médium 2 — 0,1 % tensidu, médium 3 — 0,2 % tensidu, médium 4 — 0,25 % melasy, médium 5 — 0,1 % tensidu a 0,25 % melasy, médium 6 — 0,2 % tensidu a 0,25 % melasy. Média 7—12 majú zvýšený obsah mikrokryštalickej celulózy na 20 g/l, inak sú totožné s médiami 1—6.

**Tensidy.** V pokusoch sme použili tensidy:

- a) neiónové: Tween 80, Slovanik NT 70, Slovanik Pv 370/b,
- b) iónové: olean draselný.

**Stimulátory produkcie celulózy:**

1. Melasa riedená vodovodnou vodou v pomere 1 : 3, pH upravené  $\text{H}_2\text{SO}_4$  na hodnotu 3,9; sterilizácia v autokláve 20 min pri pretlaku 120 kPa.

2. CSL (kukuričný výluh).
3. Sladká sušená srvátka.
4. Zmes mikroelementov (1,4 mg  $\text{ZnSO}_4$ , 5,0 mg  $\text{FeSO}_4$ , 1,1 mg  $\text{MnCl}_2$ , 4,0 mg  $\text{CoSO}_4$  na 1 l média).

*Inokulum.* Na všetky pokusy sme použili vegetatívne 48-hodinové inokulum, ktoré sme získali 48-hodinovou kultiváciou spór *Trichoderma viride* HV 4 v médiu 1 na závesnej rotačnej trepačke (120 ot./min) pri teplote 28 °C.

*Kultivácia.* Kultúru sme vo všetkých pokusoch kultivovali v 500 ml bankách so 100 ml média, ktoré sme očkovali 3 ml inokula. Kultivovali sme na závesnej rotačnej trepačke (120 ot./min) pri 28 °C 10 dní.

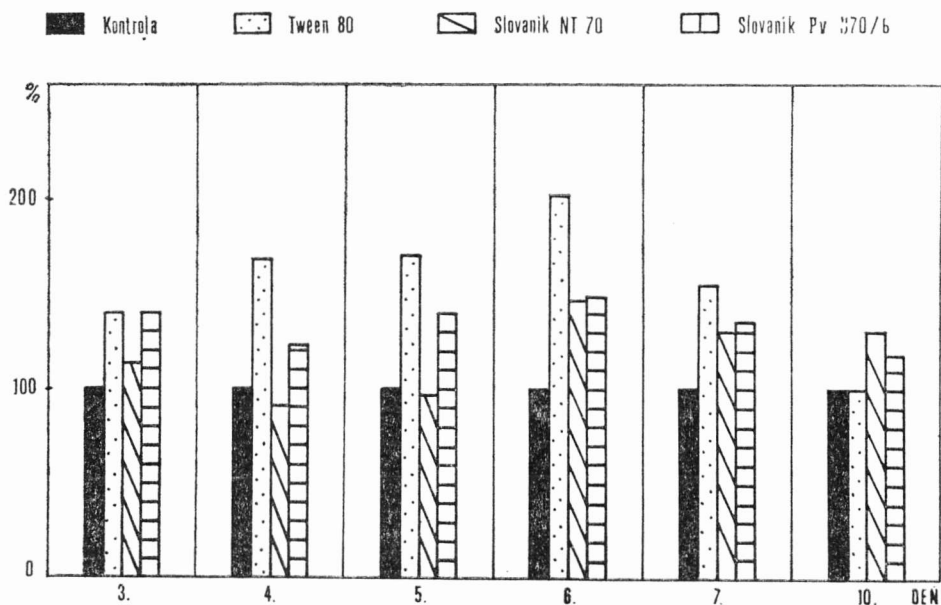
*Stanovenie aktivity celuláz.* Aktivitu celuláz sme stanovovali ako totálnu aktivitu metódou FPA, ktorá je založená na fotometrickom stanovení redukujúcich cukrov vzniknutých hydrolýzou substrátu — filtračného papiera Whatman 1 [6]. Celulázovú aktivitu sme vyjadrili v nanokataloch ako nanomóly glukózy vytvorené za sekundu.

## Výsledky a diskusia

Produkciu celuláz sme sledovali kultiváciou *Trichoderma viride* HV 4 na modifikovanom Mandelsovej médiu s obsahom 10 g · l<sup>-1</sup> a 20 g · l<sup>-1</sup> mikrokryštalickej celulózy. Základné médium sme obmieňali prídavkom dvoch koncentrácií štyroch tenzidov a prídavkom rozličných stimulátorov produkcie celuláz. Použili sme tri neiónové tenzidy — Tween 80, Slovanik NT 70, Slovanik Pv 370/b a jeden iónový tenzid — olean draselný. Všetky tenzidy okrem Tweenu 80 sú domácej výroby. Produkciu celuláz sme sledovali od tretieho do desiateho dňa kultivácie v 24-hodinových intervaloch metódou FPA.

Použitie tenzidy v koncentráciách 0,1 i 0,2 % stimulovali produkciu celuláz skúmaného kmeňa HV 4. Výnimku tvorí iba olean draselný, ktorý produkciu celuláz najmä v prvých dňoch kultivácie výrazne inhiboval, čo potvrdzuje známe fakty o negatívnom pôsobení iónových tenzidov na mikroorganizmy. Stimulačný účinok neiónových tenzidov sa na začiatku kultivácie výrazne neprejavil. K najvyššej stimulácii produkcie celuláz došlo na šiesty deň kultivácie najmä použitím tenzidu Tween 80, ktorý mal výrazný stimulačný účinok v priebehu takmer celej kultivácie. Pri koncentrácii tenzidov v médiu 0,1 % bol stimulačný účinok Tweenu 80 112 %, Slovanika NT 70 46% a Slovanika Pv 370/b 49 % (obr. 1).

Pri dvojnásobnej koncentrácii tenzidov v médiu bol stimulačný účinok Tweenu 80 opäť vysoký — 102 %, Slovanika NT 70 53 % a Slovanika Pv 370/b 49 %. Uvedené výsledky platia pre šiesty deň kultivácie, keď bola pro-



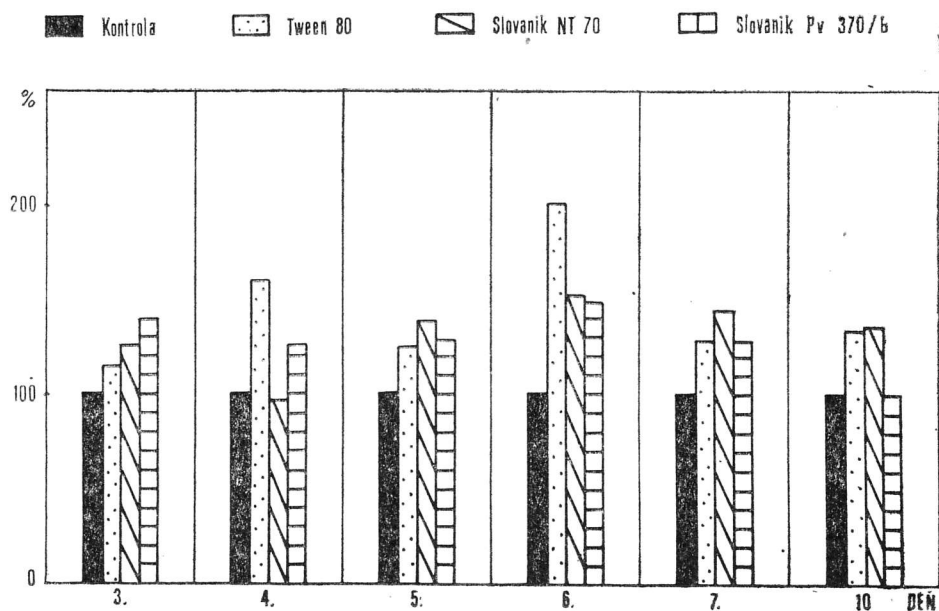
Obr. 1. Grafické znázornenie vplyvu prídavku 0,1 % tensidov na produkciu celulózy hubou *Trichoderma viride* HV 4.

Fig. 1. The effect of adding 1% tensides on cellulase production by the fungus *Trichoderma viride* HV 4.

dukcia enzýmov najvyššia. Produkciu celulózy počas celého sledovaného obdobia (10 dní) znázorňuje obrázok 2.

V ďalších pokusoch sme sledovali vplyv rozličných všeobecných stimulátorov na produkciu celulózy študovanou kultúrou. Zistili sme, že kukuričný výluh (CSL), zmes mikroelementov a sladká srvátka v rozličných koncentráciách v kultivačnom médiu produkciu celulózy iba málo ovplyvňuje, preto sme sa v ďalších pokusoch sústredili iba na melasu a jej kombinácie s tensidmi. 0,25 % prídavok samej melasy k základnému médiu produkciu celulózy stimuluje v priebehu celej kultivácie. K najvyššej produkcii celulózy došlo na šiesty deň kultivácie aj pri použití zmesi 0,25 % melasy a tensidov v oboch koncentráciách. Pri prídavku 0,1 % tensidu a 0,25 % melasy do média mal najväčší stimulačný účinok Slovanik Pv 370/b — 138 %. Tween 80 zvyšoval v zmesi s melasou produkciu celulózy o 112 % a Slovanik NT 70 o 71 % v porovnaní s kontrolným médiom (obr. 3). Olean draselný sa v tomto prípade prejavil indiferentne.

Zo zmesi 0,25 % melasy s dvojnásobnou koncentráciou tensidov pridávaných do základného média produkciu celulózy najviac stimulovala zmes Tweenu 80 a Slovanika NT 70; vplyvom oboch produkcia celulózy stúpala o 136 %.



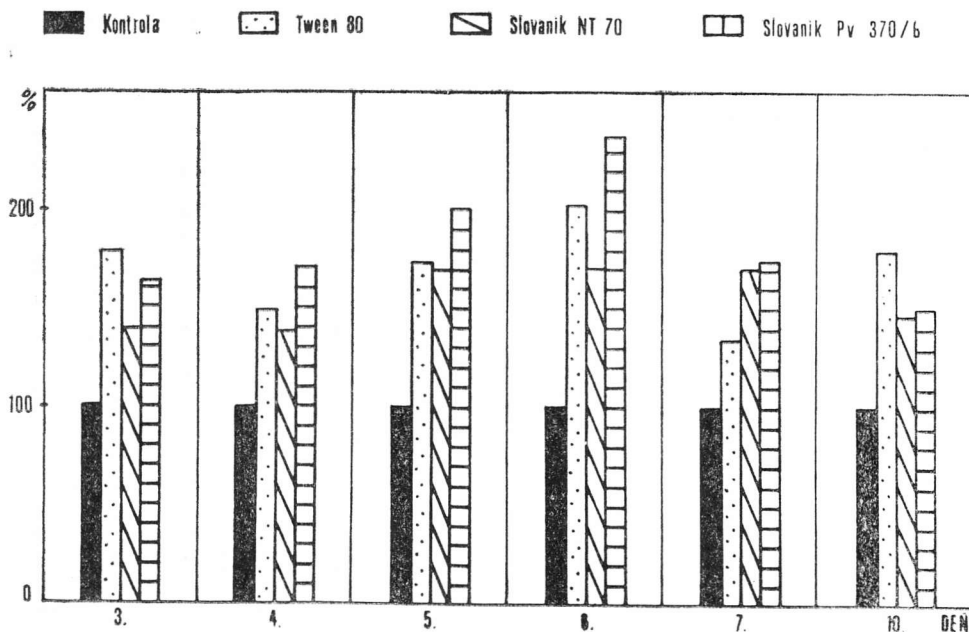
Obr. 2. Grafické znázornenie vplyvu prídavku 0,2 % tensidov na produkciu celulózy hubou *Trichoderma viride* HV 4.

Fig. 2. The effect of adding 0,2% tensides on cellulase production by the fungus *Trichoderma viride* HV 4.

Zmes Slovanika Pv 370/b v koncentrácii 0,2 % s 0,25 % melasy produkciu celulózy na šiesty deň kultivácie stimuloval menej ako v koncentrácii 0,1 %. Prídavok zmesi tensidov a melasy do média mal počas celej 10-dňovej kultivácie pomerne vysoký stimulačný účinok, pričom oba Slovaniky mali stimulačný efekt približne rovnaký ako Tween 80 (obr. 3, 4).

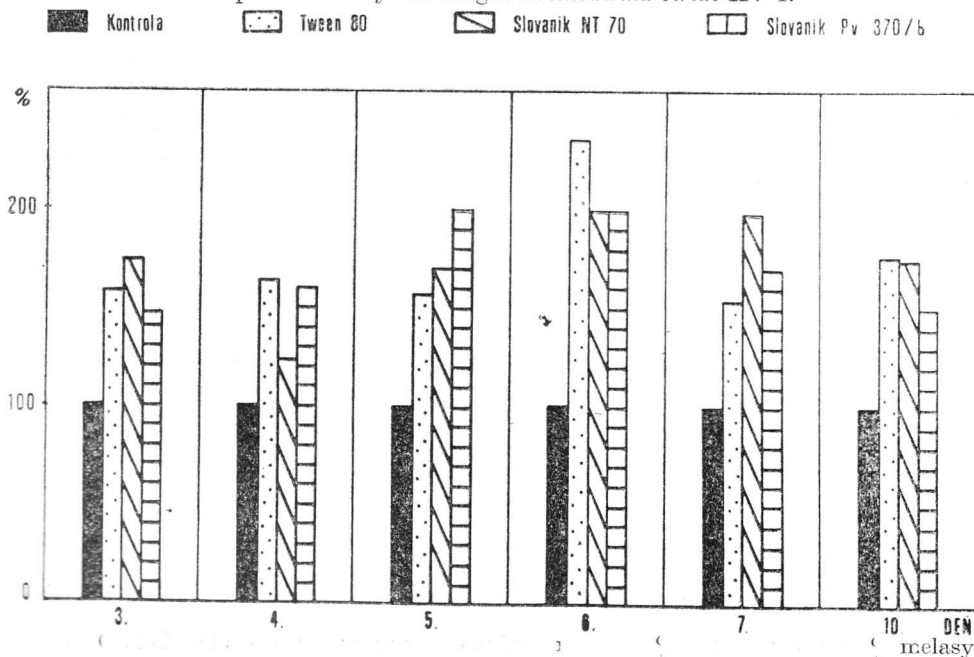
Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že pri kultiváciách možno Tween 80 nahradiť výrobkami domácej produkcie, Slovanikom NT 70 alebo Slovanikom Pv 370/b, ktoré na rast mikroorganizmov a na produkciu exoenzýmov pôsobia rovnako dobre ako Tween 80.

V odbornej literatúre sa uvádza aj zvýšenie koncentrácie substrátu ako jedna z možností stimulovať produkciu enzýmov. V našej práci sme túto možnosť stimulácie produkcie enzýmu vyskúšali. Koncentráciu mikrokryštalickej celulózy ako substrátu v kultivačnom médiu sme zvýšili o 100 %, t. j. z 10 g . l<sup>-1</sup> na 20 g . l<sup>-1</sup>. Do tohto média sme takisto pridali tensidy a melasu v koncentráciách, ktoré sme už uviedli. Na rozdiel od mnohých údajov v odbornej literatúre sme so zvýšenou koncentráciou mikrokryštalickej celulózy v médiu nedosiahli pozitívne výsledky. Zvýšené množstvo celulózy v médiu nemalo na produkciu enzýmov pozitívny vplyv ani vtedy, keď sme proporcio-



Obr. 3. Grafické znázornenie vplyvu prídavku zmesi 0,1% tensidov a 0,25% melasy na produkciu celulózu hubou *Trichoderma viride* HV 4.

Fig. 3. The effect of adding the mixture of 0.1 % tensides and 0.25 % molasses on cellulase production by the fungus *Trichoderma viride* HV 4.



na produkciu celulózu hubou *Trichoderma viride* HV 4.

Fig. 4. The effect of adding the mixture of 0.2% tensides and 0.25% molasses on cellulase production by the fungus *Trichoderma viride* HV 4.

nálne zvýšili množstvo zdroja dusíka v médiu. Podľa nášho názoru ide v prípade takejto stimulácie o špecifickú vlastnosť jednotlivých kultúr, prípadne kmeňov a pravdepodobne nemá všeobecnú platnosť.

Okrem produkcie enzýmov sme pri kultivácii študovanej huby sledovali aj vplyv pridávaných látok na tvorbu biomasy a utilizáciu mikrokryštalickej celulózy ako zdroja uhlíka. Zistili sme, že neiónové tenzidy tvorbu biomasy a utilizáciu celulózy pozitívne ovplyvňujú, kým olean draselný ako iónový tenzid neprejavil v tomto prípade výrazné pozitívne ani negatívne účinky.

### Literatúra

1. LEE, S. E. — ARMIGER, W. B.: Biotechnol. Bioeng., 20, 1980, č. 1, s. 141.
2. RYU, D. D. Y. — MANDELS, M.: Enzym. Microb. Technol., 2, 1980, s. 91.
3. REESE, E. T. — SIU, R. G. H. — LEWINSON, H. S.: J. Bacteriol., 59, 1950, s. 485.
4. GOTTWALDOVÁ, M.: Výroba a vlastnosti mikrobiálních celulas. Kvasný Prům., 27, 1981, č. 10, s. 232.
5. ZEMANOVIČ, J. — ŠKÁRKA, B. — VOLLEK, V.: Vplyv tenzidov na metabolické procesy u huby *Trichoderma viride* In: Zborník z XV. seminára o tenzidoch a detergentoch. Ústí n. Labem, DT ČSTVS 1981, s. 22.
6. MANDELS, M. — STERNBERG, D.: J. Ferment. Technol., 54, 1976, s. 267.

### Изучение влияния поверхностно-активных веществ и субстратов на продукцию целлюлаз грибом *Trichoderma viride* HV 4

#### Резюме

В работе изучалось влияние субстрата и различных поверхностно-активных веществ на продукцию целлюлаз грибом *Trichoderma viride* HV 4. Самая высокая продукция целлюлаз была достигнута путем добавления смеси поверхностно-активных веществ и мелассы в основной носитель, содержащий 1 % микрокристаллической целлюлозы. Среди использованных поверхностно-активных веществ, наряду с Tween 80, хорошо зарекомендовали себя и продукты отечественного производства — Slovanik NT 70 и Slovanik Pv 370/b.

## **A study of tenside and substrate influence on the production of cellulases by the fungus *Trichoderma viride* HV 4**

### **Summary**

The influence of the substrate and some different tensides on the production of the *Trichoderma viride* HV 4 cellulases was studied. The highest production of the cellulases was reached by adding the mixture tenside—molasse to the basic medium (with 1 % of the microcrystalline cellulose). Besides Tween 80, some inland tensides — Slovanik NT 70 and Slovanik Pv 370/b gave good results, too.