

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

6(2) 2007



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Rada Programowa *Acta Scientiarum Polonorum*

Kazimierz Banasik (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn),
Florian Gambuś (Kraków), Franciszek Kluza (Lublin), Edward Niedźwiecki (Szczecin),
Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Jerzy Sobota (Wrocław) – przewodniczący,
Stanisław Socha (Siedlce), Waldemar Uchman (Poznań)

Rada Naukowa serii *Biotechnologia*

Danuta Witkowska (Wrocław) – przewodnicząca, Włodzimierz Bednarski (Olsztyn),
Włodzimierz Grajek (Poznań), Anna Maraz (Budapeszt, Węgry),
Zdzisław Targoński (Lublin), Vesna Zechner-Krpan (Zagrzeb, Chorwacja)

Korekta:

Janina Szydłowska
Elżbieta Winiarska-Grabosz

Łamanie

Teresa Alicja Chmura

Projekt okładki

Daniel Morzyński

ISSN 1644-065X

*Wydanie publikacji dofinansowane ze środków Uniwersytetu Przyrodniczego
we Wrocławiu*

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,
Wrocław 2007

Redaktor naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki
ul. Sopotka 23, 50-344 Wrocław, tel./fax (71) 328-12-77
e-mail: wyd@ozi.ar.wroc.pl <http://www.up.wroc.pl>

Nakład 300 + 16 egz. Ark. druk. 2,25
Drukarnia: F.P.H. „ELMA”

WYBRANE ASPEKTY NABYWANIA U ROŚLIN ODPORNOŚCI TYPU SAR

Urszula Złotek, Wiesław Wójcik

Akademia Rolnicza w Lublinie

Streszczenie. Odporność nabywaną przez rośliny można ogólnie podzielić na lokalną i systemową. Rozpatrując odporność systemową wyróżniamy dwa główne jej typy, tj. **nabytą odporność systemiczną (SAR)** i **indukowaną odporność systemiczną (ISR)**. Efekty obydwu tych typów odporności są podobne – ekspresja genów związanych z produkcją białek PR. Różnice pomiędzy SAR i ISR dotyczą głównie mechanizmów ich nabywania, czemu poświęca się ostatnio coraz więcej uwagi. W niniejszej pracy omówiono wybrane aspekty nabywania odporności typu SAR, obejmują one:

- udział w tym procesie białek wiążących kwas salicylowy,
- funkcjonowanie fosforylacji w błonie cytoplazmatycznej,
- aktywność kanałów wapniowych w błonie cytoplazmatycznej,
- aktywację białek G,
- udział reaktywnych form tlenu (RFT).

Słowa kluczowe: nabyta odporność systemiczna, indukowana odporność systemiczna, białka PR, kwas salicylowy, geny odporności, geny wirulencji

Ochronie roślin przed patogenami stawiane są ostatnio coraz większe wymagania. Dotyczą one nie tylko ilości uzyskanego plonu, ale kładzie się obecnie nacisk także na jakość uzyskanego produktu oraz na ochronę środowiska. Dlatego też coraz więcej uwagi poświęca się badaniom mechanizmów odpornościowych – konstytutywnych i indukcyjnych – jakimi dysponują rośliny [Pospieszny 2000a i b].

Odpowiedź rośliny na działanie patogenu może mieć charakter lokalny bądź systemowy. Pierwszą reakcją na atak patogenu jest często reakcja nadwrażliwości (HR, hypersensitive response) wywoływana przez roślinę w celu ograniczenia rozprzestrzeniania się patogenu, a objawiająca się lokalną martwicą komórek wokół zakażonego miejsca. Wynikiem HR oprócz zamierania tkanek są często zmiany w metabolizmie rośliny prowadzące do produkcji metabolitów uruchamiających mechanizmy wytwarzania odporności systemicznej [Kombrink i Schmelzer 2001, Ollerstaml i in. 2002].

- Odporność systemiczną nabywaną przez rośliny można podzielić na dwa główne typy:
- nabyta odporność systemiczna (SAR, systemic acquired resistance),
 - indukowana odporność systemiczna (ISR, induced systemic resistance).

Istotą obydwu wyżej wymienionych typów odporności jest uruchomienie w roślinie naturalnych mechanizmów obronnych zabezpieczających ją przed licznymi i różnorodnymi patogenami i szkodnikami [Pospieszny 2000b, Handschuh 1999]. Różnice między SAR i ISR dotyczą między innymi szlaków ich nabywania. Odporność typu SAR jest indukowana poprzez kwas salicylowy i jego metabolity funkcjonalne lub nabywana w wyniku lokalnej infekcji patogenu. Odporność typu ISR jest wzbudzana przez niepatogenne bakterie kolonizujące korzenie roślin (np. *Pseudomonas sp.*), jak również czynniki abiotyczne takie jak etylen, kwas arachidonowy, kwas jasmonowy, kwas absycynowy [Pospieszny 2000b, Starck 1999, Pieterse i in. 2000, Watanabe i in. 2001]. O różnicach w mechanizmie nabywania tych dwóch typów odporności świadczy też fakt, że rolę cząsteczki sygnałowej w SAR pełni kwas salicylowy (SA, salicylic acid) i nadtlenek wodoru, natomiast w alternatywnej do SAR – indukowanej odporności systemicznej (ISR) rolę sygnałową przypisuje się dwóm niezależnym cząsteczkom – są to kwas jasmonowy i etylen [Pospieszny 2000b, Handschuh 1999, Starck 1999].

Fakt, iż kwas salicylowy pełni ważną funkcję sygnałową w SAR, udokumentowano już dosyć dawno. Obniżony poziom kwasu salicylowego powoduje, że nie rozwija się w tych roślinach systemiczna odporność typu SAR, co powoduje, że są one bardziej wrażliwe na grzyby, bakterie i wirusy [Pospieszny 2000b, Friedrich i in. 1995, Mauch-Mani i Métraux 1998, Pieterse 2000, Świdorski i Świdorska 1999].

Każdy z patogenów może wywołać infekcję u ograniczonej liczby roślin. Hipoteza „gen-gen” zakłada, że gen wirulencji (Avr) w genomie patogenu, odpowiada genowi odporności (R) w roślinie. Taki układ nazwano niekompatybilnym, a odporność uruchamianą na tej drodze określa się jako „host”. Natomiast w układzie kompatybilnym nie ma wzajemnie odpowiadających sobie genów (R-Avr), a mechanizm uruchamiający odporność nazwano „nonhost”. Z odpornością tego typu mamy do czynienia, gdy jeden gatunek roślin wykazuje odporność na wiele gatunków patogenów głównie w wyniku konstytutywnie wytwarzanych związków przeciwbakteryjnych i różnorodnych barier ochronnych, jakimi te rośliny dysponują. Odporność „nonhost” można określić jako typ odporności stałej i ilościowej w odróżnieniu od „host”, którą opisuje się jako odporność jakościową i uruchamianą w odpowiedzi na niekompatybilne patogeny [Mysore i Ryu 2004, Heath 2000, Gurr i Rushton 2005].

Geny R kodują białka represorowe wchodzące w interakcje z produktami ekspresji genów Avr i w ten sposób powodują przekazywanie sygnału do wytwarzania odporności systemowej.

Wykorzystując podobieństwa w strukturze i lokalizacji produktów genów R podzielono je na cztery klasy:

- I. Geny kodujące białka zlokalizowane w cytoplazmie, zawierające sekwencję wiążącą nukleotydy oraz domenę z licznymi powtórzeniami bogatymi w leucynę zlokalizowaną na C-końcu tegoż białka – geny NB-LRR (nucleotide binding – leucine reach repeat), które podzielono na dwie podgrupy:
 - a. Geny kodujące białka zawierające na N-końcu domenę zwiniętego kłęбка – geny CC-NB-LRR (coiled-coil- nucleotide binding – leucine reach repeat).
 - b. Geny kodujące białka zawierające na N-końcu domenę podobną do transbłonowych receptorów Toll i interleukiny-1 – geny TIR-NB-LRR (toll and interleukin-1 transmembrane receptors – nucleotide binding – leucine reach repeat).

- II. Geny kodujące białka o aktywności kinazy serynowo-treoninowej, np. gen Pto wyizolowany z pomidora nadający odporność na bakterię *Pseudomonas syringae pv tomato*.
- III. Geny kodujące białka z wewnątrzkomórkową domeną LRR i cytoplazmatyczną domeną o aktywności kinazy. Przykładem tej grupy genów jest gen Xa21 z ryżu zapewniający odporność na patogen bakteryjny *Xanthomonas oryzae pv oryzae*.
- IV. Geny podobne do genów grupy III – kodujące białka z wewnątrzkomórkową domeną LRR, których C-koniec również zakotwiczony jest w błonie cytoplazmatycznej, ale w odróżnieniu od poprzedniej grupy białka te nie zawierają domeny cytoplazmatycznej o aktywności kinazy. Przykładem genów tej grupy są geny pomidora – Cf-2, Cf-4, Cf-5, Cf-9 nadające odporność na patogena grzybowego *Cladosporium fulvum* [Krzymowska 1998, Gebhardt 1997, Jones 1996, Jones 2001, Tör i in. 2004, Gurr i Rushton 2005].

Roślina zaopatrzona w gen R reaguje na specyficzny elicytor, który jest produktem genu Avr. Umieszczenie receptora wiążącego te unikalne cząsteczki sygnałowe jest ciągle jeszcze dyskutowane – najczęściej lokalizowany jest on w błonie cytoplazmatycznej, choć należy wziąć pod uwagę również inne miejsca, tzn. ścianę komórkową, cytozol czy niektóre składniki wewnątrzkomórkowe [Mauch-Mani i Métraux 1998, Płazek 1999, Blumwald i in. 1998, Ji i in. 1998, Somssich i Hahlbrock 1998]. Przykładem takiej zależności jest gen Pto (z grupy genów R) wyizolowany z pomidora, „korespondujący” z genem AvrPto z *Pseudomonas syringae pv tomato*, jak również gen Prf wyizolowany z tej samej rośliny, któremu odpowiada ten sam gen Avr z *Pseudomonas syringae pv tomato*. Produkty genów Pto i Prf są białkami różniącymi się strukturą. Produkt genu Pto jest białkiem o aktywności kinazy serynowo-treoninowej. Produkt genu Prf należącego do I klasy genów R jest białkiem zawierającym sekwencję wiążącą nukleotydy (NB), liczne powtórzenia bogate w leucynę (LRR) oraz na N-końcu białka domenę suwaka leucynowego (LZ, leucine zippers). Rola tych charakterystycznych domen białkowych występujących w produktach wyżej wymienionych genów dowodzi, iż pierwszym elementem uruchomienia kaskady reakcji prowadzących do wywołania odporności są interakcje pomiędzy białkami – produktami genów odporności R i genów Avr [Krzymowska 1998, Blumwald 1998]. Shan i in. [2000] zidentyfikowali w białku AVRPTO z *Pseudomonas syringae pv tomato* dwa różne regiony specyficznie oddziałujące z białkiem PTO z pomidora i tytoniu. Białko PTO jako kinaza posiada zdolność fosforylacji innych białek włączanych w szlak indukcji odporności systemicznej (np. białka PTII z pomidora), co sugeruje ważną rolę procesu fosforylacji w przekazywaniu sygnału o infekcji [Krzymowska 1998, Blumwald 1998, Sessa i in. 2000]. W przypadku białka PRF nie stwierdzono bezpośredniego oddziaływania tegoż białka z białkiem AVRPTO. Motywy LRR biorą udział w oddziaływaniach m.in. białko-białko – przypuszcza się, że domena ta umożliwia interakcje białka kodowanego przez gen R z kolejnymi białkowymi składnikami w kaskadzie przekazywania sygnału. Domeny NB i LZ umożliwiają oddziaływanie między białkami poprzez tworzenie konformacji zwinętego kłęбка [Blumwald i in. 1998, Krzymowska 1998].

Nowsze badania doprowadziły do powstania hipotezy strażników (guard hypothesis) będącej niejako uzupełnieniem teorii „gen-gen”. Zgodnie z założeniami tej hipotezy białko R aktywuje odporność dopiero po interakcji z innym roślinnym białkiem („strażnikiem”), które na skutek ataku przez patogen jest modyfikowane [Van der Hoorn i in. 2002, McDowell i Woffender 2003, Hammond-Kosack i Parker 2003].

W ostatnich latach prowadzonych jest wiele badań na temat mechanizmów nabywania odporności typu SAR. Ponieważ istnieje duża różnorodność układów patogen – roślina, a także ogromna różnorodność elicytorów stymulujących receptory błonowe rośliny, uniwersalność tych mechanizmów może dotyczyć tylko pewnych zasad transmisji sygnałów wiodących do ekspresji specyficznych genów obronnych (Pr) [Floryszak-Wieczorek 1999].

Dlatego też w pracy tej poruszono niektóre tylko procesy biorące udział w wytwarzaniu tego typu odporności, a mianowicie:

- rolę białek wiążących kwas salicylowy,
- łańcuch fosforylacji w błonie cytoplazmatycznej,
- aktywację kanałów wapniowych w błonie cytoplazmatycznej,
- aktywację białek G,
- wybuch oddechowy i udział reaktywnych form tlenu (RFT) w nabywaniu SAR [Płażek 1999, Floryszak-Wieczorek 1999, Scheel 1998].

Jedne z pierwszych hipotez dotyczących działania kwasu salicylowego jako pierwotnego mediatora w przekazywaniu sygnału dla SAR mówiły o inibicji katalazy przez SA. Zahamowanie aktywności katalazy wiązało się z kolei ze wzrostem stężenia nadtlenu wodoru (H_2O_2) i innych reaktywnych form tlenu w tkankach. Nadtlenek wodoru i inne odmiany RFT działają w tym modelu nabywania SAR jako wtórne przekaźniki w transdukcji sygnału, prowadząc do ekspresji genów Pr [Mauch-Mani i Métraux 1998].

Hipoteza ta w toku dalszych badań została jednakże zakwestionowana, ponieważ pojawiły się doniesienia sugerujące, że:

- indukcja białek PR (dokładniej PR-1) nie była efektem działania SA na katalazę,
- aktywność katalazy nie zawsze spadała po inokulacji patogenem,
- poziom SA w tkankach roślin po stymulacji odporności jest zbyt mały, aby mógł hamować aktywność katalazy,
- wysokie stężenia H_2O_2 stymulują produkcję kwasu salicylowego.

Inhibicja katalazy przez SA okazała się ponadto tylko przykładem inibicji enzymów, których grupy prostetyczne zawierają Fe^{2+} związane hemowo lub niehemowo. Kwas salicylowy reaguje bowiem z Fe^{2+} oddając elektrony i w ten sposób powstają bardzo reaktywne rodniki salicylowe [Bostock 1999, Mauch-Mani i Métraux 1998, Świdorski i Świdorska 1999, Farmer i in. 2003].

Obecnie mówi się o trzech typach białek wiążących kwas salicylowy – białka SABP (salicylic acid-binding protein), które zidentyfikowała grupa badawcza prof. Klessiga:

I typ – wyizolowane z tytoniu cytoplazmatyczne białko o aktywności katalazy.

II typ (SABP2) – to wyizolowane również z cytoplazmy tytoniu białko o masie 25 kDa, posiadające dużo większe od katalazy powinowactwo do SA. Badania biochemiczne wykazały, że SABP2 posiada aktywność esterazową, a stymulowane kwasem salicylowym, również aktywność lipazy.

III typ (SABP3) – to zidentyfikowane w chloroplastach tytoniu białko o aktywności anhidrazy węglanowej. Badania tego enzymu u drożdży wykazały, iż posiada on aktywność antyoksydacyjną [Dempsey i Klessig 1995, Forouhar i in. 2005, Kawano i in. 2004, Kumar i Klessig 2003].

UDZIAŁ FOSFORYLACJI W NABYWANIU ODPORNOŚCI

Badania *in vivo* wskazują, że kaskada fosforylacji jest włączona w szlak obrony przed patogenami drogą SAR na różnych poziomach. Fosforylacja zainicjowana może być już przez receptor o aktywności kinazy serynowo-treoninowej. Fosforylacja tego białka może aktywować cały szlak sygnałowy uruchamiający odporność poprzez indukcję syntezy kwasu salicylowego [Blumwald i in. 1998, Scheel 1998, Sessa i in. 2000].

Zidentyfikowano także białka oddziałujące z kinazą będącą produktem genu *Pto* pomidora – białka te są przypuszczalnymi aktywatorami genów *Pr* na poziomie transkrypcji [Scheel 1998, Blumwald i in. 1998, Zhou i in. 1997].

Odkąd okazało się, że zarówno SA, jak i patogeny (np. wirus mozaiki tytoniowej) aktywują kinazę MAP (mitogen-activated protein kinase), pojawiło się przypuszczenie, iż enzym ten włączany jest w szlak transdukcji sygnału w SAR [Mauch-Mani i Métraux 1998].

Jako czynniki przekazywania sygnału do nabywania odporności u roślin zidentyfikowano dość dużą klasę kinaz wykazujących homologię do kinaz aktywowanych przez mitogen (kinaz MAP). W komórkach pietruszki traktowanych oligopeptydowym elicytorem wykazano aktywację kinazy MAP wrażliwej na elicytor, którą nazwano kinazą ERM (elicitor-responsive MAP kinase) [Scheel 1998, Ligtering i in. 1997]. Po aktywacji kinaza ERM transportowana jest do jądra komórkowego gdzie może być włączana w aktywację genów. Przypuszcza się, że kilka czynników transkrypcyjnych w odpowiedzi obronnej rośliny regulowanych jest właśnie przez fosforylację. Z tytoniu wyizolowano z kolei kinazę indukowaną przez salicylany, zwaną kinazą SIP (salicylate-responsive MAP kinase) oraz kinazę indukowaną zranieniem (WIPK – wound-induced protein kinase). Udział kinazy SIP w transdukcji sygnału potwierdzają badania, w których zastosowano biologicznie aktywne analogi aktywujące ten rodzaj kinazy MAP. Udowodniono, iż pod wpływem tej kinazy zachodzi indukcja białek PR [Scheel 1998, Maleck i Lawton 1998, Zhang i Klessig 1997, Suzuki 2002].

W ostatnich latach dość dużo uwagi w badaniach mechanizmów nabywania odporności u roślin poświęca się aktywowanym przez SA produktom genów *Npr-1* (no PR expression), zwanych też genami *Nim* (non-inducible immunity). Geny *Npr* kontrolują procesy nabywania SAR, które uruchamiane są przez kwas salicylowy w odróżnieniu od genów *Cpr* (constitutive PR) regulujących procesy zachodzące w tkankach przed wzrostem poziomu SA. Produktami tych genów (*Npr*) są regulatorowe białka włączane w transdukcję sygnału w SAR – są to białka zawierające cztery regiony podobne do domen ankirynowych z homologią do $I\chi$ -B, to jest inhibitora transkrypcji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną ssaków [Świdorski i Świdorska 1999, Krzymowska 1998, Dong 2001, Pieterse i Van Loon 2004].

Inne badania sugerują z kolei udział łańcucha redox w aktywacji genów *Npr*. Po infekcji patogenem następuje akumulacja SA i środowisko komórki rośliny nabywa bardziej redukującego charakteru prawdopodobnie w wyniku akumulacji antyoksydantów. W tych warunkach *NPR-1* jest przekształcany z nieaktywnego kompleksu oligomerycznego w aktywny stan monomeryczny poprzez redukcję wewnątrzcząsteczkowych grup disulfidowych pochodzących z cysteiny. Monomeryczny *NPR-1* transportowany jest do jądra komórkowego, gdzie oddziałuje z TGA, co daje aktywację genów *Pr-1* [Pieterse i Van Loon 2004].

UDZIAŁ BIAŁKA G W ZAPOCZĄTKOWANIU KASKADY REAKCJI PROWADZĄCYCH DO SAR

Proponowane modele transdukcji sygnału w SAR podkreślają istotną rolę białka G w początkowych etapach nabywania odporności. Białka G można sklasyfikować w dwóch rodzinach:

- heterotrimeryczne białka G zbudowane z trzech podjednostek: α , β , γ
- małe monomeryczne białka G zawierające tylko podjednostkę α .

Obydwie wymienione rodziny białek G współpracują z guanozynotrójfosforanem (GTP). Miejsca wiązania GTP znajdują się w podjednostce α [Blumwald i in. 1998].

Niektórzy autorzy podkreślają, że białko G aktywuje fosfolipazę C, która uwalnia z 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP₂) 1,4,5-trifosforan inozytolu (IP₃) i diacyloglicerol (DAG). IP₃ i DAG uznawane są za wtórne przekaźniki w komórkowej odpowiedzi na elicytor, w której końcowym etapem jest fosforylacja białek aktywujących ekspresję genów Pr [Płazek 1999].

Inne badania dowodzą o stymulacji kanałów wapniowych w błonie cytoplazmatycznej drogą aktywacji białka G [Suharsono i in. 2002].

UDZIAŁ AKTYWACJI KANAŁÓW WAPNIOWYCH W INDUKCJI ODPORNOŚCI TYPU SAR

W badaniach odporności u pietruszki zidentyfikowano specyficzny elicytor, który po przyłączeniu do odpowiadającego mu receptora w tej roślinie powoduje otwarcie błonowych kanałów jonowych, co wpływa na wzrost poziomu wapnia cytoplazmatycznego [Zimmermann i in. 1997].

Inny przepuszczalny dla Ca²⁺ kanał był aktywowany u pomidora w odpowiedzi na specyficzny elicytor z *Cladosporium fulvum* [Gelli i in. 1997].

Wzrost stężenia wapnia cytoplazmatycznego obserwowano też w tytoniu, w odpowiedzi na różne elicytory.

Istnieją hipotezy mówiące, iż otwarcie kanałów wapniowych następuje bezpośrednio po związaniu elicytora, inne hipotezy sugerują, że następuje to poprzez aktywację białek G [Blumwald i in. 1998].

Wzrost poziomu wapnia cytoplazmatycznego prowadzi do „wybuchu oddechowego” i wzrostu zawartości w tkankach H₂O₂ i innych reaktywnych form tlenu, które to przez wielu autorów uważane są za wtórne przekaźniki w procesie nabywania odporności typu SAR [Pietras i in. 1997, Romeis i in. 2000].

UDZIAŁ H₂O₂ W NABYWANIU ODPORNOŚCI TYPU SAR

Jedną z wczesnych odpowiedzi rośliny na atak patogena jest generowanie reaktywnych form tlenu, co porównywane jest przez wielu autorów do wybuchu tlenowego w granulocytach obojętnochłonnych ssaków [Kuźniak i Urbanek 1999, Milosevic i Slusarenko 1996, Van Breusegem i in. 2001]. Badania dowodzą, że RFT z „wybuchu oddechowego” powstają głównie przy udziale enzymów takich jak oksydaza ksantynowa czy błonowa oksydaza NADPH. Aktywność tego enzymu regulowana jest u roślin na drodze fosforylacji i defosforylacji przez odpowiednie kinazy i fosfatazy białkowe

biorące udział w szlaku transdukcji sygnału [Somssich i Hahlbrock 1998, Pietras i in. 1997, Milosevic i Slusarenko 1996, Low i Merida 1996]. Częstoczkami produkowanymi w wyniku działania tych enzymów są głównie: anionorodnik nadtlenkowy (O_2^-), którego produkcję przez błonową oksydazę NADPH stwierdzono np. u ziemniaka po indukcji przez *Phytophthora infestans*, a także H_2O_2 produkowany przez wymienione wyżej enzymy [Milosevic i Slusarenko 1996].

W układach *in vitro* wykazano, że generowanie H_2O_2 w warunkach stresu biotycznego przebiega dwufazowo:

- I faza następuje w kilka minut po infekcji i jest niespecyficzna,
- II faza trwa do kilku godzin po infekcji, jest odpowiedzialna za reakcje nadwrażliwości i ma charakter specyficzny, tzn. występuje tylko w interakcji z patogenem niekompatybilnym [Kuźniak i Urbanek 1999].

Rola H_2O_2 jako przekaźnika sygnału w SAR była dyskutowana odkąd zauważono, że:

- kwas salicylowy inaktywuje katalazę i inne enzymy usuwające H_2O_2 ,
- w wyniku działania kwasu salicylowego następuje wzrost poziomu H_2O_2 ,
- H_2O_2 i układy produkujące nadtlenek wodoru indukują SAR [Van Camp i Van Montagu 1998].

Stąd też uważa się obecnie, że H_2O_2 z wybuchu oddechowego pełni rolę wtórnego przekaźnika sygnału w procesie nabywania przez roślinę odporności systemicznej. Podwyższony poziom RFT indukuje bowiem działanie genów kodujących białka PR. Drugi model wskazuje na H_2O_2 jako na sygnał nadrzędny w stosunku do kwasu salicylowego w systemie przekazywania sygnałów w SAR – wykazano bowiem, że egzogenne H_2O_2 indukuje akumulację kwasu salicylowego w liściach tytoniu, aktywując hydroksylazę kwasu benzoowego katalizującą ostatni etap syntezy tego związku [Świdorski i Świdorska 1999].

Reasumując podkreślić należy, że H_2O_2 generowany w warunkach stresu biotycznego jest nie tylko negatywnym skutkiem infekcji, ale pełni także rolę uniwersalnego sygnału redoks wykorzystywanego przez roślinę do indukcji odporności systemicznej.

Ostatecznym efektem wyżej opisanych mechanizmów jest ekspresja genów Pr, co daje roślinie odporność na patogeny. Do związków warunkujących tę odporność zaliczyć możemy enzymy, tj. chitynazę, β -1,3-glukanazę, peroksydazy, a także liczną grupę związków niskocząsteczkowych określanych mianem fitoaleksyn [Gawlik i Wójcik 1997, Kuć 1997].

Wykorzystując SAR jako metodę ochrony roślin przed patogenami należy się zastanowić, czy produkty genów Pr w procesie nabywania odporności mogą mieć wpływ na jakość wytworzonego surowca roślinnego.

PIŚMIENNICTWO

- Blumwald E., Aharon GS., Lam BC-H., 1998. Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. Elsevier Science Ltd. September, 3(9), 342-346.
- Bostock R. M., 1999. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 99-109.
- Dempsey D. A. i Klessig D. F., 1995. Signal in plant disease resistance. *Bull. Inst. Pasteur*, 93, 167-186.

- Dong X., 1998. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 316-323.
- Dong X., 2001. Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 309-314.
- Farmer E.E., Alméras E., Krishnamurthy V., 2003. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 372-378.
- Floryszak-Wieczorek J., 1999. Fizjologiczno-biochemiczna charakterystyka nabytej odporności systemicznej [SAR] liści ziemniaka (*Solanum tuberosum* L. cv. *Bintje*) na grzyb *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. [rozprawa habilitacyjna]. *Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu. Rozprawy Naukowe*, ISSN 0208-8436; z. 302.
- Forouhar F., Yang Y., Kumar D., Chen Y., Fridman E., Park S. W., Chiang Y., Acton T. B., Montelione G. T., Pichersky E., Klessig D. F., Tong L., 2005. Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *PNAS*, 102 (5), 1773-1778.
- Friedrich L., Vernooij B., Gaffney T., Morse A., Ryals J., 1995. Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Mol. Biol.*, 29, 959-968.
- Gawlik U., Wójcik W., 1997. Niektóre aspekty indukowanej odporności roślin na patogeny grzybowe. *Postępy Nauk Rolniczych*, 3, 21-29.
- Gebhardt C., 1997. Plant genes for pathogen resistance – variation on a theme. Elsevier Science Ltd., July, 2(7), 243-244.
- Gelli A., Higgins VJ., Blumwald E., 1997. Activation of plant plasma membrane Ca²⁺-permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol.*, 113, 269-279.
- Gurr S. J., Rushton P. J., 2005. Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? *TRENDS in Biotechnology*, 23(6), 275-282.
- Hammond-Kosack K. E., Parker J. E., 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 177-193.
- Handschuh L., 1999. Etylen a reakcje obronne roślin. *Biotechnologia*, 3(46): 86-93.
- Heath M. C., 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 315-319.
- Ji C., Smith-Becker J., Keen NT., 1998. Genetics of plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 202-207.
- Jones J.D.G., 1996. Plant disease resistance genes: structure, function and evolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 7, 155-160.
- Jones J.D., 2001. Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 281-287.
- Kawano T., Furuichi T., Muto S., 2004. Controlled salicylic acid levels and corresponding signaling mechanisms in plants. *Plant Biotechnology* 21(5), 319-335.
- Kombrink E. i Schmelzer E., 2001. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of Plant Pathology* 107, 69–78.
- Krzymowska M., 1998. Roślinne geny odporności i ich rola podczas infekcji. *Post. Bioch.*, 44(4), 318-325.
- Kuć J., 1997. Molecular aspects of plant responses to pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19(4), 551-559.
- Kumar D. I. Klessig D. F., 2003. High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *PNAS*, 100(26), 16101-16106.
- Kuźniak E., Urbanek H., 1999. Rola nadtlenku wodoru w odpowiedzi roślin na czynniki stresowe. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 469, 43-48.

- Ligtering W., Kroj T., zur Nieden U., Hirt H., Scheel D., 1997. Receptor-mediated activation of MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science*, 276, 2054-2057.
- Low P. S., Merida J.R., 1996. The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol. Plant.*, 96, 533-542.
- Maleck K., Lawton K., 1998. Plant strategies for resistance to pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 208-213.
- Mauch-Mani B. and Métraux J., 1998. Salicylic acid and systemic resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*, 82, 535-540.
- McDowell J. M., Woffenden B. J., 2003. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *TRENDS in Biotechnology*, 21(4), 178-183.
- Milosevic N., Slusarenko A. J., 1996. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.*, 49, 143-158.
- Mysore K. S., Ryu C-M., 2004. Nonhost resistance: how much do we know? *TRENDS in Plant Science*, 9(2), 97-104.
- Ollerstam O., Rohfritsch O., Höglund S., Larsson S., 2002. A rapid hypersensitive response associated with resistance in the willow *Salix viminalis* against the gall midge *Dasineura marginemtorquens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 102, 153-162.
- Pieterse CMJ, Van Loon LC., 2004. NPR1: the spider in web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 456-464.
- Pieterse CMJ, Van Pelt JA, Ton J, Parchmann S, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Van Loon LC., 2000. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.*, 57, 123-134.
- Pietras T., Małolepsza U., Witusik A., 1997. Udział nadtlenu wodoru i reaktywnych postaci tlenu wytwarzanych przez oksydazę NADPH w odporności roślin przeciwko patogenom. *Wiadomości Botaniczne*, 41(3/4), 43 – 50.
- Plażek A., 1999. Interactions between host plants and pathogens. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 469, 79-87.
- Pospieszny H., 2000a. Dotychczasowy rozwój i dalsze perspektywy ograniczania strat powodowanych przez choroby roślin. *Postępy w Ochronie Roślin*, 40(1), 84-92.
- Pospieszny H., 2000b. Nabyta odporność systemiczna roślin na patogeny – od nauki do praktyki. *Postępy Nauk Rolniczych*, 5, 27-42.
- Romeis T., Piedras P., Jones J. D. G., 2000. Resistance Gene-Dependent Activation of a Calcium-Dependent Protein Kinase in the Plant Defense Response. *The Plant Cell*, 12, 803-815.
- Scheel D., 1998. Resistance response physiology and signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 305-310.
- Sessa G., D'Ascenzo M., Martin G. B., 2000. The major site of the Pti1 kinase phosphorylated by the Pto kinase is located in activation domain and is required for Pto-Pti1 physical interaction. *Eur. J. Biochem.*, 267, 171-178.
- Shan L., Thara V. K., Martin G. B., Zhou J-M., Tang X., 2000. The pseudomonas AvrPto protein is differentially recognized by tomato and tobacco and is localized to the plant plasma membrane. *The Plant Cell*, 12, 2323-2337.
- Somssich IE., Hahlbrock K., 1998. Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Elsevier Science, March*, 3(3), 86-90.
- Starck Z., 1999. Niektóre aspekty zróżnicowania reakcji roślin na niekorzystne warunki środowiska – stare problemy, nowa interpretacja. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 469, 145-158.
- Suharsono U., Fujisawa Y., Kawasaki T., Iwasaki Y., Satoh H., Shimamoto K., 2002. The heterotrimeric G protein α subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *PNAS*, 99(20), 13307-13312.
- Suzuki K., 2002. MAP kinase cascades in elicitor signal transduction. *J. Plant Res.*, 115, 237-244.

- Świdorski M., Świdorska A., 1999. Genetyczne podstawy odporności roślin. *Biotechnologia*, 3(46), 36-44.
- Tör M., Brown D., Cooper A., Woods-Tör A., Sjölander K., Jones J. D. G., Holub E. B., 2004. Arabidopsis downy mildew resistance gene RPP27 encodes a receptor-like protein similar to CLAVATA2 and tomato Cf-9. *Plant Physiol.*, 135, 1100-1112.
- Van Breusegem f., Vranová E., Dat J. F., Inzé D., 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, , 161, 405-414.
- Van Camp W., Van Montagu M., 1998. H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Elsevier Science*, September 3(9), 330-334.
- Van der Hoorn R. A. L., De Wit P. J. G. M., Joosten M. H. A. J., 2002. Balancing selection favors guarding resistance proteins. *TRENDS in Plant Science*, 7(2), 67-71.
- Van Loon L. C., 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 753-765.
- Watanabe T., Fujita H., Sakai S., 2001. Effects of jasmonic acid and ethylene on the expression of three genes for wound-inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in winter squash (*Cucurbita maxima*). *Plant Science* 161, 67-75.
- Zhang S., Klessig DF., 1997. Salicylic acid activates a 48 kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell*, 9, 809-824.
- Zhang S., Reddy M. S., Kloepper J. W., 2002. Development of assays for assessing induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control*, 23, 79-86.
- Zhou J., Tang X., Martin GB., 1997. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. *EMBO J.*, 16, 3207-3218.
- Zimmermann S., Nürnberger T., Frachisse J-M., Wirtz W., Guern J., Hedrich R., Scheel D., 1997. Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺ – permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 94, 2751-2755.

SOME ASPECTS OF MECHANISMS OF ACQUIRING IMMUNITY IN PLANTS

Summary. Resistance in plants may be divided into local and systemic. The systemic resistance can be in two types: **systemic acquired resistance (SAR)** and **induced systemic resistance (ISR)**. Effects of both these types of resistance are similar – it is expression of pathogenesis-related proteins (of PR proteins). The differences between SAR and ISR are connected mainly with mechanisms of their acquisition, to which more and more attention has been paid recently. In the article selected some aspects of mechanisms of SAR acquisition are discussed in which the following factors take part:

- salicylic-acid-binding protein
- phosphorylation chain in the cytoplasmic membrane
- activation of calcium channels in the cytoplasmic membrane
- activation of G proteins
- oxygen burst

Key words: systemic acquired resistance, induced systemic resistance, salicylic acid, pathogenesis-related proteins, resistance gene, avirulence gene

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 29.06.2007

BIOSYNTETA FITAZ, FOSFATAZ ORAZ CELULAZ I KSYLANAZ W HODOWLACH GRZYBÓW STRZĘPKOWYCH W PODŁOŻU STAŁYM

Anita Rywińska, Danuta Witkowska, Michał Piegza,
Małgorzata Jarosz, Justyna Salamon

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. W pracy przebadano cztery szczepy grzybów strzępkowych *Aspergillus niger* 551, *Aspergillus cervinus* 219, *Rhizopus nigricans* 500 i *Trichoderma reesei* M7-1 pod względem uzdolnień do biosyntezy fitaz, fosfataz oraz enzymów towarzyszących, tj. celulaz i ksylianaz, w hodowlach w podłożu stałym (solid state fermentation – SSF). Jako źródło węgla wykorzystano wysłodki buraczane, otręby pszenne oraz zmieloną fasolę. Przeprowadzono 14-dniowe procesy hodowlane przy stałym poziomie wilgotności wynoszącym 63%.

Wszystkie grzyby syntetyzowały fitazy, fosfatazy, celulazy i ksylianazy, przy czym wartości aktywności kształtowały się na różnym poziomie w zależności od szczepu, źródła węgla, jak i czasu procesu. Największymi uzdolnieniami do biosyntezy zarówno fitaz, jak i fosfataz charakteryzował się szczep *A. niger* 551. Podłoże z wysłodkami buraczanymi najbardziej sprzyjało produkcji enzymów defosforylujących; najwyższe uzyskane w tych warunkach aktywności wynosiły dla fitaz w 3 dobie – 15,20 U g⁻¹ (*A. niger* 551) i fosfataz w 12 dobie – 39,35 U g⁻¹ (*T. reesei* M7-1). Otręby pszenne były najefektywniejszym źródłem węgla w biosyntezie zarówno ksylianaz, jak i celulaz. Najwyższą aktywność ksylianaz uzyskano z udziałem szczepu *R. nigricans* 500, 279,5 U g⁻¹ (3 doba), natomiast celulaz – w hodowli szczepu *T. reesei* M7-1, 12,9 U g⁻¹ (5 doba).

Słowa kluczowe: grzyby strzępkowe, fitazy, fosfatazy, celulazy, ksylianazy, solid-state

WSTĘP

Hodowle mikroorganizmów w podłożu stałym (solid state fermentation, SSF) znane były już w czasach starożytnych. Zupełnie ignorowane i zapomniane podczas II wojny światowej, ponownie przykuły uwagę badaczy w latach 1950–1960, kiedy to udokumentowano otrzymanie steroidów w reakcji transformacji przy użyciu kultur grzybów.

Adres do korespondencji – Corresponding author: Anita Rywińska, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C. K. Norwida 25/27, 50-375 Wrocław, e-mail: aryw@ozi.ar.wroc.pl

W latach 1960–1970 z powodzeniem wykorzystano ten typ hodowli do produkcji mykotoksyn. Następnym osiągnięciem była produkcja białka wzbogacającego pasze dla bydła, przy czym proces ten połączono z utylizacją odpadów rolno-spożywczych, co z innej strony wywołało zainteresowanie środowiska naukowego [Hölker i in. 2004].

Dotychczas hodowle SSF prowadzone były na małą skalę, ze względu na takie problemy, jak m.in. utrzymanie dostatecznej wilgotności, odpowiedniego pH, ekstrakcja czy oczyszczanie końcowych produktów. Z drugiej strony, system SSF ma też wiele zalet, które przemawiają za tym, aby hodowle węgłne zastąpić w przyszłości hodowlami w podłożu stałym. Korzyści te mogą mieć wydźwięk biologiczny oraz związany z techniczną stroną procesu. Zalety biologiczne to głównie utylizacja substancji stałych, możliwość stosowania mieszanych kultur mikroorganizmów, w tym „dzikich” szczepów, znaczące obniżenie albo całkowity zanik hamowania katalitycznego. Do zalet związanych z technicznymi aspektami produkcji można zaliczyć mniejsze zużycie wody, energii potrzebnej do ogrzewania, łatwiejsze napowietrzanie, brak konieczności stosowania substancji antypieniących i przede wszystkim możliwość użycia tanich oraz ogólnodostępnych źródeł węgla i energii. Odpady z przemysłu rolno-spożywczego idealnie spełniają te wymagania zarówno pod względem ekonomicznym, jak i ekologicznym [Krishna i Nokes 2001]. W ostatniej dekadzie zostały wykorzystane do produkcji wielu wartościowych związków, takich jak: antybiotyki, alkaloidy, roślinne regulatory wzrostu, kwasy organiczne, biopestycydy, biosurfaktanty, a także enzymy [Pandey i in. 2000].

Pomimo że około 90% wszystkich enzymów pochodzenia mikrobiologicznego produkowanych jest w hodowlach węglnych (SmF), dane literaturowe wskazują wiele przykładów, w których biosynteza przebiegała znacznie wydajniej w systemie SSF [cyt. za Pandey i in. 2001]. Wzrastające możliwości aplikacyjne enzymów wywołują coraz większe zainteresowanie ośrodków naukowych procesami SSF wykorzystywanymi do ich syntezy. Jednym z takich obszarów badawczych jest wykorzystanie enzymów pochodzenia mikrobiologicznego w produkcji pasz zwierzęcych, w celu lepszego wykorzystania wszystkich zawartych w nich składników. Wśród tych enzymów szczególną rolę odgrywają enzymy defosforylujące, fitazy i fosfatazy, a także ksylanazy i celulazy ułatwiające hydrolizę nieskrobiowych polisacharydów takich jak ksylan i celuloza [Brugger i in. 2004, König i in. 2002].

Celem pracy jest charakterystyka procesu biosyntezy enzymów defosforylujących fityniany, a także fosfataz oraz enzymów towarzyszących, tj. ksylanaz i celulaz z udziałem grzybów strzępkowych w hodowlach SSF z różnymi źródłami węgla.

MATERIAŁY I METODY

Mikroorganizmy. Przedmiotem badań były cztery szczepy grzybów strzępkowych *Aspergillus niger* 551, *Aspergillus cervinus* 219, *Rhizopus nigricans* 500 i *Trichoderma reesei* M7-1.

Szczepy przechowywano na skosach PDA (potato dextrose agar) w temperaturze 4°C i przeszczepiano raz w roku.

Grzyby pochodzą z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Podłoża. Wykorzystano podłoże mineralne o składzie (g dm⁻³): NH₄NO₃ (23), MgSO₄ x 7H₂O (4,6), NaCl (4,6). Jako źródło węgla stosowano: wysłodki buraczane,

otręby pszenne oraz zmieloną fasolę w ilości 10 g (sterylizowane dwukrotnie z dodatkiem 5 cm³ wody).

Warunki prowadzenia hodowli. Hodowle prowadzono w kolbach Erlenmayera zawierających 10 g źródła węgla i 10 cm³ podłoża mineralnego, przy wilgotności utrzymywanej, poprzez codzienne uzupełnianie wody, na poziomie 63%. Kolby inkubowano w temperaturze 25 °C–26 °C.

Po 3, 5, 7, 10, 12 i 14 dobach zawartość kolb z przerośniętym grzybnią podłożem ekstrahowano przy użyciu 100 cm³ 0,1% roztworu Tween'u 80. Całą zawartość kolb wstrząsano przy 168 rpm, w temperaturze 25 °C przez 60 minut. Tak otrzymaną zawiesinę poddano wirowaniu na wirówce MPW-52 (10000 x g przez 10 min), a następnie przesączono. Uzyskany w ten sposób ekstrakt poddano dalszej analizie.

Inokulum każdorazowo stanowiła zawiesina zarodników (1 cm³) uzyskana poprzez zmyw ze skosu 1% roztworem Tween 80. Gęstość zawiesiny wynosiła około 10⁶ zarodników w 1 cm³.

METODY ANALIYCZNE

Oznaczenie aktywności fitaz. Aktywność fitaz oznaczano wobec 1% roztworu soli sodowej kwasu fitynowego (0,1 g soli sodowej kwasu fitynowego w 10 cm³ 0,1 M buforu octanowego o pH 5.11). Reakcję enzymatyczną prowadzono w enzymatycznie czystych próbkach przez 30 min w temperaturze 55 °C. Mieszanina reakcyjna zawierała: w próbach właściwych 600 µL substratu, 200 µL roztworu badanego enzymu oraz 200 µL 25mmol CaCl₂. Reakcję przerywano przez dodanie 1 cm³ 5 % roztworu kwasu tróchlorooctowego (TCA). W próbach kontrolnych roztwór enzymu wprowadzano po dodaniu TCA.

Po zakończeniu reakcji enzymatycznej w próbach oznaczono zawartości uwolnionych fosforanów metodą Fiske-Subbarowa [1925] wobec standardu zawierającego 80 µg·cm⁻³ fosforanu.

Aktywności fitaz wyrażono jako ilość µmoli uwolnionych fosforanów w czasie 1 minuty w przeliczeniu na 1 g źródła węgla w podłożu (U g⁻¹).

Oznaczenie aktywności fosfataz. Aktywność fosfataz oznaczano wobec 0,15% roztworu dwusodowego fosforanu 4-nitrofenolu (0,15 g soli w 100 cm³ 0,2 M buforu octanowego o pH 5.11). Reakcję enzymatyczną prowadzono przez 30 min w temperaturze 37 °C. Mieszanina reakcyjna zawierała: w próbach właściwych 250 µL substratu i 250 µL roztworu badanego enzymu. Reakcję przerywano przez dodanie 0,5 cm³ 0,05 M NaOH. W próbach kontrolnych roztwór enzymu wprowadzano po dodaniu NaOH. Ilość uwolnionego p-nitrofenolu mierzono przy długości fali 405 nm wobec próby ślepej, która zawierała 0,5 cm³ 0,2 M buforu octanowego i 0,5 cm³ 0,05 M NaOH.

Aktywność fosfataz wyrażono w µmolach powstałego p-nitrofenolu w czasie 1 minuty w przeliczeniu na 1 g źródła węgla (U g⁻¹).

Oznaczenie aktywności celulaz. Aktywność celulaz oznaczano w obecności – 1% roztworu karboksymetylocelulozy (30 min, temp. 50 °C, pH 4,8) i wyrażano w µmolach cukrów redukujących oznaczanych metodą z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym (DNS) [Miller 1959] DNS (glukoza jako standard), uwalnianych z substratu w ciągu 1 minuty w przeliczeniu na 1 g źródła węgla (U g⁻¹).

Oznaczenie aktywności ksylanaz. Aktywność ksylanaz oznaczano wobec substratu – 1% roztworu ksylanu brzoźowego (30 min, temp. 50 °C, pH 4,8) i wyrażano w µmolach

cukrów redukujących oznaczanych z DNS (w przeliczeniu na ksylozę), uwalnianych z substratu w ciągu 1 minuty w przeliczeniu na 1 g źródła węgla (U g^{-1}).

OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników

W niniejszej pracy poddano ocenie uzdolnienia czterech szczepów grzybów strzępkowych, *Aspergillus niger* 551, *Aspergillus cervinus* 219, *Rhizopus nigricans* 500 i *Trichoderma reesei* M7-1 do wytwarzania fitaz, fosfataz, celulaz i ksylanaz w hodowlach solid state fermentation (SSF). Jako źródło węgla w tych procesach wykorzystano wysłodki buraczane, otręby pszenne oraz zmieloną fasolę.

W tabelach 1–3 przedstawiono najwyższe, uzyskane przez szczepy, aktywności fitaz i fosfataz, odczyn środowiska hodowlanego oraz zawartość fosforanów w ekstraktach uzyskanych z dnia hodowli odpowiadającego maksymalnej aktywności.

W podłożu zawierającym wysłodki buraczane (tab. 1) wysokie aktywności zarówno fitaz, ($15,2 \text{ U g}^{-1}$), jak i fosfataz ($37,55 \text{ U g}^{-1}$) uzyskano z udziałem szczepu *A. niger* 551. Interesujący jest fakt, że grzyby *T. reesei* M7-1 i *R. nigricans* 500 syntetyzowały wydajnie fosfatazy przy bardzo niskim poziomie fitaz.

Tabela 1. Produkcja fitaz i fosfataz przez różne szczepy grzybów strzępkowych w hodowlach solid state zawierających wysłodki buraczane jako źródło węgla

Table 1. Phytase and phosphatase production by different strains of filamentous fungi in solid state cultures with beet pulp as a carbon source

Szczep Strain	Aktywność fitaz [U g^{-1}] Phytase activity [U g^{-1}]	Czas [doba] Time [day]	pH	Zawartość fosforanów [mg g^{-1}] Amounts of phosphate [mg g^{-1}]	Aktywność fosfataz [U g^{-1}] Activity of phosphatase [U g^{-1}]	Czas [doba] Time [day]	pH	Zawartość fosforanów [mg g^{-1}] Amounts of phosphate [mg g^{-1}]
<i>A. niger</i> 551	15,20	3	4,2	8,07	37,55	3	4,2	8,07
<i>A. cervinus</i> 219	1,63	14	4,9	7,39	14,91	7	4,0	7,28
<i>R. nigricans</i> 500	1,14	14	3,5	0,85	26,47	5	3,2	0,84
<i>T. reesei</i> M7-1	0,055	12	3,9	0,17	39,35	12	3,9	0,17

Szczep *A. niger* 551 wyróżniał się spośród innych badanych szczepów również najwyższą aktywnością fitaz w hodowlach na podłożu z otrębami pszennymi, chociaż dwukrotnie niższą niż w podłożu z wysłodkami (tab. 2). Ten sam szczep syntetyzował także znaczne ilości fosfataz, $34,5 \text{ U g}^{-1}$. Podłoże z otrębami było również sprzyjające dla produkcji fitaz przez szczep *T. reesei* M7-1, który w podłożu z wysłodkami buraczanymi wykazał minimalne aktywności. W przypadku szczepów *A. cervinus* 219 i *R. nigricans* 500 najwyższe aktywności fitaz uzyskano w końcowych dobach hodowli i wynosiły one, odpowiednio $1,59 \text{ U g}^{-1}$ i $1,46 \text{ U g}^{-1}$. Ilość wydzielanych przez te szczepy fosfataz nie przekraczała $6,77 \text{ U g}^{-1}$.

W podłożu ze zmieloną fasolą, jako producenci fitaz, wyróżniały się tylko szczepy *A. niger* 551 oraz *A. cervinus* 219, natomiast fosfatazy wydajnie syntetyzował tylko pierwszy z wymienionych szczepów (tab. 3).

Tabela 2. Produkcja fitaz i fosfataz przez różne szczepy grzybów strzępkowych w hodowlach „solid state” zawierających otręby pszenne jako źródło węgla

Table 2. Phytase and phosphatase production by different strains of filamentous fungi in „solid state” cultures with wheat bran as a carbon source

Szczep Strain	Aktywność fitaz [U g ⁻¹] Phytase activity [U g ⁻¹]	Czas [doba] Time [day]	pH	Zawartość fosforanów [mg g ⁻¹] Amounts of phosphate [mg g ⁻¹]	Aktywność fosfataz [U g ⁻¹] Activity of phosphatase [U g ⁻¹]	Czas [doba] Time [day]	pH	Zawartość fosforanów [mg g ⁻¹] Amounts of phosphate [mg g ⁻¹]
<i>A. niger</i> 551	6,29	12	7,3	8	34,5	3	6,7	8,08
<i>A. cervinus</i> 219	1,59	14	7,1	6,42	4,10	5	6,1	6,22
<i>R. nigricans</i> 500	1,46	14	6,6	8,53	6,77	7	6,2	8,5
<i>T. reesei</i> M7-1	2,02	12	7,7	6,72	12,57	14	7,5	6,72

Tabela 3. Produkcja fitaz i fosfataz przez różne szczepy grzybów strzępkowych w hodowlach „solid state” zawierających fasolę jako źródło węgla

Table 3. Phytase and phosphatase production by different strains of filamentous fungi in „solid state” cultures with bean as a carbon source

Szczep Strain	Aktywność fitaz [U g ⁻¹] Phytase activity [U g ⁻¹]	Czas [doba] Time [day]	pH	Zawartość fosforanów [mg g ⁻¹] Amounts of phosphate [mg g ⁻¹]	Aktywność fosfatazy [U g ⁻¹] Activity of phosphatase [U g ⁻¹]	Czas [doba] Time [day]	pH	Zawartość fosforanów [mg g ⁻¹] Amounts of phosphate [mg g ⁻¹]
<i>A. niger</i> 551	3,61	3	4,5	8,26	17,98	14	5,2	8,13
<i>A. cervinus</i> 219	3,18	12	5,3	6,38	2,53	12	5,3	6,38
<i>R. nigricans</i> 500	0,028	7	5,4	0,080	0,19	14	5,5	0,086
<i>T. reesei</i> M7-1	0,13	12	7,6	0,81	1,37	14	7,5	0,81

Dobór właściwego źródła węgla, spełniającego jak najwięcej wymagań efektywnej hodowli mikroorganizmów, stanowi podstawowy przedmiot badań wielu ośrodków naukowych z dziedziny biotechnologii. Wykorzystane w niniejszej pracy wysłodki buraczane oraz otręby pszenne, obok miąższu owoców, słomy, zmielonych nasion, kolb kukurydzianych są najczęściej stosowanymi, w procesach hodowlanych z udziałem mikroorganizmów, odpadami z przemysłu rolno-spożywczego [Hölker i wsp. 2004]. Jednak, jak podają dane literaturowe, substraty przeznaczone do produkcji fitaz powinny być bogate w fityniany, stąd w tych procesach najczęściej wykorzystywane są otręby pszenne, mąka sojowa, kukurydziana, z ryżu oraz zmielony rzepak, zwłaszcza odmiany „canola” [Liu i in. 1998, Pandey i wsp. 2001, Purva i Banerjee 2004, Chantasartramee i wsp. 2005, Nagashima i wsp. 1999]. W dostępnym piśmiennictwie nie ma wiele danych na temat stosowania do biosyntezy fitaz fasoli. Wzmiankę o takim substracie znalaziono w pracy Mandviwala i Khire [2000], którzy wykorzystali mąkę z czarnej fasoli. Uzyskana przez szczep *A. niger* NCIM 563 aktywność na tym źródle węgla była wysoka i wynosiła 84,7 U g⁻¹. Podobnie wcześniejsze badania autorów niniejszego opracowania wskazały ten substrat jako najlepszy, w hodowlach wglębnych, dla szczepów *A. niger* 551 i *A. cervinus* 219 [Witkowska i in. 2007]. W stosunku do wyników, jakie uzyskały te szczepy, w nieco innych warunkach w hodowli SSF ze zmieloną fasolą, aktywności prezentowane w niniejszej pracy są ponad 5-krotnie wyższe.

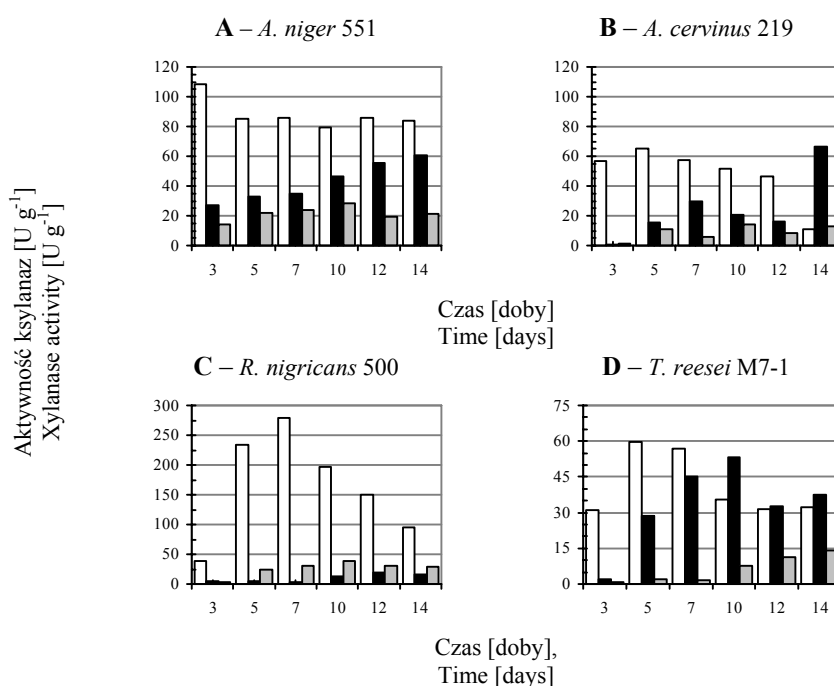
Mandviwala i Khire [2000] uzyskali wysokie wartości aktywności fitaz, tj. $\sim 80 \text{ U g}^{-1}$, w hodowlach SSF z otrębami pszczyznymi z udziałem grzybów *A. niger* NCIM 563. Natomiast Bogar i wsp. [2003] w hodowlach *A. ficuum* NRRL 3135 oraz *R. oligosporus* NRRL 5905 osiągnęli wartości, porównywalne z otrzymanymi w niniejszej pracy, odpowiednio $15,29 \text{ U g}^{-1}$ i $0,78 \text{ U g}^{-1}$. Nieco wyższą aktywność fitaz, 25 U g^{-1} oraz fosfataz, 42 U g^{-1} , autorzy uzyskali na podłożu (z otrębami) wzbogaconym roztworem skrobi. Otręby pszenne (10 g i $6,5 \text{ cm}^3$ wody destylowanej) w swoich badaniach wykorzystał również Chantasartrasamee i wsp. [2005]. Uzyskana przez szczep *A. oryzae* AK9 aktywność fitaz wynosiła $1,8 \text{ U g}^{-1}$, a po wzbogaceniu podłoża dodatkowo w 2 g mąki ryżowej $4,5 \text{ U g}^{-1}$.

Na podstawie wcześniejszych wyników [Rywińska i in. 2006, Witkowska i in. 2007] w niniejszej pracy zdecydowano się przeprowadzić czternastodniowe procesy hodowlane. Tak długi czas nie był konieczny w przypadku szczepu *A. niger* 551, który w większości przeprowadzonych hodowli maksimum aktywności uzyskiwał w początkowych dobach (tab. 1–3). Szczególnie w podłożu z wysłódkami buraczanymi maksimum aktywności zarówno fitaz, jak i fosfataz przypadało na 3 dobę. W środowisku zawierającym otręby również na początku hodowli szczep ten osiągnął maksymalną aktywność fosfataz. Natomiast w podłożu z fasolą po 3 dobie znacząco obniżała się biosynteza fitaz (dane nieprezentowane). Tak krótki czas hodowli (3–4 dni) stosowali w swojej pracy Bogar i wsp. [2003]. Nagashima i wsp. [1999] oraz Chantasartrasamee i wsp. [2005] prowadzili cztero- i pięciodniowe hodowle, natomiast eksperyment Mandviwala i Khire [2000] trwał osiem dni, a najwyższą aktywność szczep uzyskał w 7 dobie. W prezentowanej pracy kilkakrotnie odnotowano stały wzrost aktywności fitaz i fosfataz, aż do 12 lub 14 doby (tab. 1–3). Na uwagę zasługują wyniki uzyskane z udziałem szczepu *T. reesei* M7-1, który przy generalnie niskich aktywnościach fitaz produkował, zwłaszcza w końcowych dobach, znaczne ilości fosfataz. Najwyższą aktywność tych enzymów, $39,35 \text{ U g}^{-1}$, szczep uzyskał w podłożu z wysłódkami buraczanymi w 12 dobie, co sugeruje, iż czas eksperymentu powinien być dobierany indywidualnie, nie tylko pod kątem szczepu, syntetyzowanych enzymów, ale również źródła węgla.

O efektywnej biosyntezie enzymów decyduje nie tylko rodzaj źródła węgla oraz czas hodowli, ale również odczyn ekstraktu pohodowlanego. W niniejszej pracy najwyższe pH (około 7) obserwowano u wszystkich badanych grzybów, w hodowlach z otrębami (tab. 2). W pracy Bogar i wsp. [2003] w ośmiodniowej hodowli na otrębach odczyn ekstraktu wahał się między pH 4.0 a 7.0, przy czym najwyższe aktywności przypadały na doby, w których pH zbliżało się do 7.0, podobnie jak w niniejszej pracy. Generalnie jednak, najwyższe aktywności syntetyzowanych enzymów zarówno fitaz, jak i fosfataz uzyskano w podłożu z wysłódkami, co odpowiadało, jak wynika z tabeli 1, niższemu pH środowiska (3.0 – 4.9).

W ekstraktach pohodowlanych sprawdzono także poziom fosforanów (tab. 1–3). Podłoże mineralne stosowane w hodowlach nie zawierało żadnego źródła fosforu, tak więc obecność fosforanów w ekstraktach była bezpośrednio związana z ich uwalnianiem z substratów stosowanych jako źródło węgla. Stwierdzono, że ilość oznaczonych fosforanów była szczególnie niska $< 1 \text{ mg g}^{-1}$ w hodowlach grzybów *R. nigricans* 500 i *T. reesei* M7-1 w podłożach z fasolą i wysłódkami buraczanymi, te szczepy w tych podłożach produkowały bardzo niewielkie ilości fitaz. We wszystkich pozostałych wariantach hodowlanych poziom oznaczonych fosforanów wynosił od 6,15 do 8,79 mg g^{-1} .

Szczepki grzybów w omawianych hodowlach solid state wykazywały także uzdolnienia w kierunku produkcji ksylanaz i celulaz. Jak wynika z rysunku 1 najlepszym źródłem węgla dla biosyntezy ksylanaz, inaczej niż w przypadku fitaz i fosfataz, były otręby pszenne. Spośród grzybów należących do rodzaju *Aspergillus* zdecydowanie lepszym producentem ksylanaz okazał się szczep *A. niger* 551, dla którego najwyższa aktywność, w 3 dobie, wynosiła $108,15 \text{ U g}^{-1}$, od 5 doby szczep syntetyzował ksylanazy na wyrównanym poziomie, około 80 U g^{-1} . Zdecydowanie najwyższą aktywność uzyskano w 7 dniu w hodowli grzyba z rodzaju *Rhizopus* $279,5 \text{ U g}^{-1}$. W hodowlach z udziałem grzybów *T. reesei* M7-1 najwyższy poziom biosyntezy ksylanaz osiągnięto w 5 dobie procesu ($59,8 \text{ U g}^{-1}$).



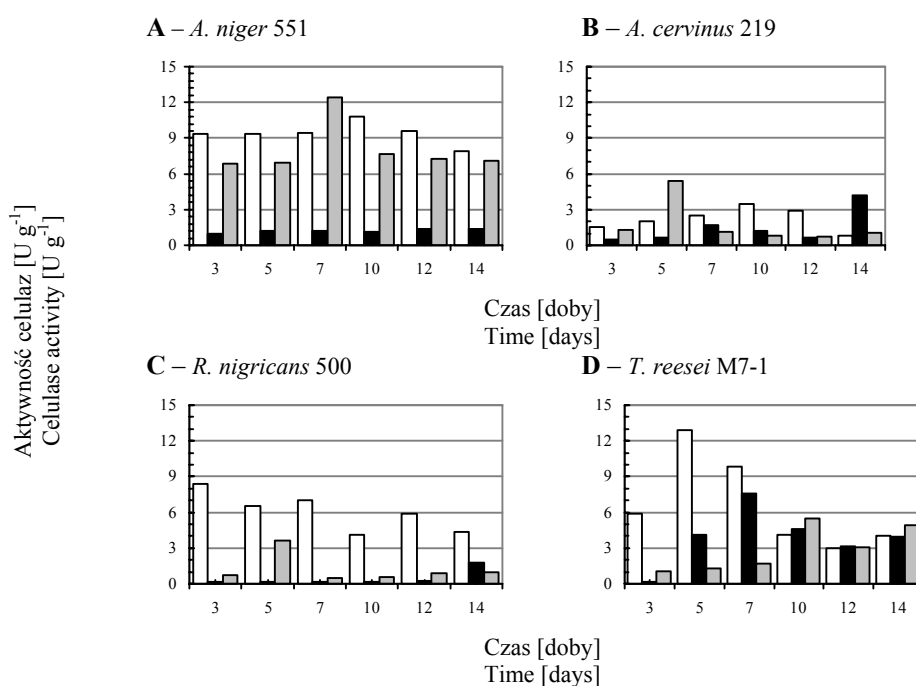
Rys. 1. Produkcja ksylanaz przez *A. niger* 551 (A), *A. cervinus* 219 (B), *R. nigricans* 500 (C), *T. reesei* M7-1 (D), podczas hodowli solid state w zależności od źródła węgla w pożywce, □ otręby, ■ fasola, ▒ wysłodki buraczane

Fig. 1. Xylanase production by *A. niger* 551 (A), *A. cervinus* 219 (B), *R. nigricans* 500 (C), *T. reesei* M7-1 (D), during solid state fermentation contained, □ wheat bran, ■ bean, ▒ beet pulp as the carbon source

Fasola jako źródło węgla sprzyjała biosyntezie ksylanaz w przypadku dwóch szczepów, *A. niger* 551, dla którego aktywność wzrastała aż do 14 doby (61 U g^{-1}) oraz *T. reesei* M7-1, który najwyższą aktywność ($53,16 \text{ U g}^{-1}$) uzyskał już w 10 dobie.

Najniższe aktywności ksylanaz szczepki wykazywały w podłożach zawierających wysłodki buraczane, co ciekawe, to podłoże sprzyjało wydajnej biosyntezie fitaz i fosfataz. Tak niskie aktywności w tych warunkach hodowlanych mogły wynikać ze znacznych ilości cukrów redukujących, jakie oznaczono w ekstraktach pohodowlanych (dane nieprezentowane).

Jak wynika z danych literaturowych, w hodowlach solid state najczęściej wykorzystywane są odpady rolnicze, takie jak słoma z pszenicy, z jęczmienia, z ryżu, kolby kukurydziane i otręby pszenne. Autorzy tych prac niejednokrotnie uzyskiwali wyższe aktywności, od prezentowanych w niniejszej publikacji, co wynika zarówno z tego, iż stosowali wyselekcjonowane oraz ulepszone na drodze genetycznej szczepy, jak i zoptymalizowane w kierunku nadprodukcji ksylanaz, warunki hodowlane [Kachlishvili i wsp. 2006, Panagiotou i wsp. 2003, Park i wsp. 2002, Polizeli i wsp. 2005, Wu M. i wsp. 2005]. W doświadczeniach w których wykorzystywano inne źródła węgla, takie jak odpady z produkcji oleju palmowego, liście bukowe czy zmielone ziarno jęczmienia, synteza ksylanaz była porównywalna lub niższa od prezentowanych przez autorów niniejszego opracowania [Prasertsan i wsp. 1997, Kachlishvili i wsp. 2006].



Rys. 2. Produkcja celulaz przez *A. niger* 551 (A), *A. cervinus* 219 (B), *R. nigricans* 500 (C), *T. reesei* M7-1 (D), podczas hodowli solid state w zależności od źródła węgla w pożywce, □ otręby, ■ fasola, ▒ wysłodki buraczane

Fig. 2. Cellulase production by *A. niger* 551 (A), *A. cervinus* 219 (B), *R. nigricans* 500 (C), *T. reesei* M7-1 (D), during solid state fermentation contained, □ wheat bran, ■ bean, ▒ beet pulp as the carbon source

Jak wynika z danych umieszczonych na rysunku 2A, najlepsze uzdolnienia do syntezy celulaz wykazał szczep *A. niger* 551. Najwyższe aktywności, 12,44 U g⁻¹, odnotowano w 7 dobie hodowli z wysłódkami oraz w 10 dobie procesu z otrębami, 10,77 U g⁻¹. Podłoże z fasolą nie sprzyjało syntezie celulaz przez ten szczep. Drugi z badanych szczepów z rodzaju *Aspergillus*, rysunek 2B, produkował znacznie mniejsze ilości celulaz, natomiast również w przypadku tego szczepu najwyższą aktywność uzyskano

w procesie z wysłodkami buraczanymi, $5,38 \text{ U g}^{-1}$. Aktywność celulolityczną szczepu *A. niger* ATTC 6275 w hodowlach SSF z odpadami po produkcji oleju palmowego badali Prasertsan i wsp. [1997]; uzyskana przez nich aktywność w 9 dobie wynosiła $23,8 \text{ U g}^{-1}$.

Szczep *R. nigricans* 500 produkował znaczne ilości celulaz w hodowli z otrębami pszennymi, przy czym najwyższą aktywność, $8,4 \text{ U g}^{-1}$, uzyskał już w 3 dobie (rys. 2C). W procesie z wysłodkami najwyższe stężenie celulaz dla tego szczepu wynosiło $3,63 \text{ U g}^{-1}$ (5 doba). Są to aktywności przewyższające cytowane w literaturze dla grzybów z rodzaju *Rhizopus*. Saito i wsp. badali aktywność celulaz produkowanych przez szczep *Rhizopus oryzae* NBRC 4707 przy wykorzystaniu takich źródeł węgla, jak miazga z buraka cukrowego, otręby pszenne i skórki z pomarańczy, uzyskane aktywności wynosiły odpowiednio $3,1 \text{ U g}^{-1}$, $1,8 \text{ U g}^{-1}$ i $0,7 \text{ U g}^{-1}$.

W badaniach własnych najwyższą aktywność celulolityczną, równą $12,9 \text{ U g}^{-1}$, otrzymano w hodowli szczepu *T. reesei* M7-1 w podłożu z otrębami (rys. 2D). Co ciekawe, ten szczep, spośród wszystkich badanych, najwydajniej produkował celulazy w hodowli ze zmieloną fasolą jako źródłem węgla; w 7 dobie hodowli aktywność wynosiła $7,62 \text{ U g}^{-1}$. Również w przypadku tego szczepu aktywności są porównywalne lub wyższe od tych prezentowanych w literaturze. Guttieres-Correa i Tengerdy [1997] wykorzystali szczep *T. reesei* LM-UC4 i wyłoki z trzciny cukrowej, uzyskana aktywność wynosiła $5,3 \text{ U g}^{-1}$. Połączenie szczepu *Trichoderma* z *A. phoenicis* pozwoliło autorom na zwiększenie ilości celulaz do $13,4 \text{ U g}^{-1}$, natomiast po zmieszaniu wyłoków z mąką sojową aktywność wynosiła około 15 U g^{-1} .

Jednym z parametrów decydujących o efektywnej biosyntezie w hodowlach SSF jest jednorodność, a także wilgotność środowiska hodowlanego. Dane literaturowe podają szeroki zakres wilgotności, od 35% nawet do 75%, przy jakich prowadzone były hodowle w podłożu stałym [Bogar i wsp. 2003, Hölker i wsp. 2004]. W niniejszej pracy wilgotność każdego procesu wynosiła 63% przez cały okres jej trwania, co wiązało się ze stałym uzupełnianiem poziomu wody.

Analiza procesu hodowlanego wskazuje celowość dalszych badań nad optymalizacją warunków prowadzenia hodowli w podłożu stałym w kierunku biosyntezy fitaz, fosfataz, ksylanaz i celulaz. Otrzymane wyniki, zwłaszcza z udziałem szczepów *A. niger* 551 oraz *T. reesei* M7-1, są obiecujące i wskazują na duże możliwości zwiększenia wydajności syntezy badanych enzymów, np. poprzez zastosowanie kultury mieszanej czy wykorzystanie mieszanych źródeł węgla.

WNIOSKI

1. Zaobserwowano zróżnicowanie w poziomie produkowanych enzymów w zależności od czasu hodowli, rodzaju źródła węgla jak i badanego szczepu grzybów.

2. Grzyby *A. niger* 551 były najefektywniejsze w biosyntezie zarówno fitaz, jak i fosfataz. Podłoże z wysłodkami buraczanymi najbardziej sprzyjało produkcji fitaz i fosfataz, najwyższe uzyskane w tych warunkach aktywności wynosiły odpowiednio dla fitaz $15,20 \text{ U g}^{-1}$ (*A. niger* 551) i fosfataz $39,35 \text{ U g}^{-1}$ (*T. reesei* M7-1).

3. Otręby pszenne były najbardziej sprzyjającym źródłem węgla w biosyntezie zarówno ksylanaz, jak i celulaz.

4. Szczep *R. nigricans* 500 wyróżniał się najwyższą aktywnością ksylanaz, $279,5 \text{ U g}^{-1}$, a szczep *T. reesei* M7-1 – celulaz ($12,9 \text{ U g}^{-1}$).

PIŚMIENNICTWO

- Bogar B., Szakacs G., Linden J.C., Pandey A., Tengerdy R.P., 2003. Optimization of phytase production by solid substrate fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 183-189.
- Brugger R., Simoes Nunes C., Hug D., Vogel K., Guggenbuhl P., Mascarello F., Augem S., Wyss M., van Loom A. P. G. M., Pasamontes L., 2004. Characteristics of fungal phytases from *Aspergillus fumigatus* and *Sartorya fumigata*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63, 383-389.
- Chantasartramee K., Na Ayuthaya D.I., Intarareugsorn S., Dharmstithi S., 2005. Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. *Process Biochemistry*, 40, 2285-2289.
- Fiske C.H., Subbarow Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66, 375.
- Gutierrez-Correa M., Tengerdy R. P., 1997. Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation, *Biotechnol. Lett.*, 19, 7, 665-667.
- Hölker U., Höfer M., Lenz J., 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale sold-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 175-186.
- Kachlishvili E., Penninckx M. J., Tsiklauri N., Elisashvili W., 2006. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation, *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 391-397.
- Krishna C., Nokes S. E., 2001. Predicting vegetative inoculum performance to maximize phytase production in solid-state fermentation using response surface methodology, *J. Ind. Microb. Biotechnol.*, 26, 161-170.
- König J., Grasser R., Pikor H., Vogel K., 2002. Determination of xylanase, β -glucanase and cellulase activity. *Anal. Bioanal. Chem.*, 374, 80-87.
- Liu B-L., Rafiq A., Tzeng Y-M., Rob A., 1998. The induction and characterization of phytase and beyond, *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 415-424.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Mandviwala T.N., Khire J.M., 2000. Production of high activity thermostable phytase from thermotolerant *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 24, 237-243.
- Miller G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
- Nagashima T., Tange T., Anazawa H., 1999. Dephosphorylation of phytate by using the *Aspergillus niger* phytase with a high affinity for phytate. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, 10, 4682-4684.
- Panagiotou G., Kekos D., Macris B. J., Christakopoulos P., 2003. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation, *Ind. Crops and Products*, 18, 37-45.
- Pandey A., Soccol C.R., Mitchell D., 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products, *Proc. Biochemistry*, 35, 1153-1169.
- Pandey A., Szakacs G., Soccol C.R., Rodriguez-Leon J.A., Soccol V.T., 2001. Production, purification and properties of microbial phyases. *Bioresource Technolgy*, 77,203-214.
- Park Y. S., Kang S. W., Lee J. S., Hong S. I., 2002. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 761-766.
- Purva V., Banerjee U.C., 2004. Production studies and catalytic properties of phytases (*myo*-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview, *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 3-14.

- Polizeli M. L. T. M., Rizzatti A. C. S., Monti R., Terenzi H. F., Jorge J. A., Amorin D. S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 577-591.
- Prasertsan P., Kittikul A. H., Kungahae J., Maneesri and Oi S., 1997. Optimization for xylanase and cellulose production from *Aspergillus niger* ATTC 6275 in palm oil mill wastes and its application, *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 13, 555-559.
- Rywińska A., Witkowska D., Grządko M., 2006. Biosynteza fitaz przez grzyby strzępkowe w podłożu zawierającym otręby pszenne jako źródło węgla, *Acta Scientiarum Polonorum, Biotechnologia*, 5 (1-2), 17-26.
- Witkowska D., Rywińska A., Piegza M., 2007. Wytwarzanie fitaz, celulaz i ksylanaz przez wybrane szczepy grzybów strzępkowych, *Żywność Nauka Technologia Jakość* (w druku).
- Wu M., Li S. C., Yao J. M., Pan R. R., Yu Z. L., 2005. Mutant of a xylanase-producing, *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 1045-1049.

BIOSYNTHESIS OF PHYTASES, PHOSPHATASES, CELULASES AND XYLANASES BY FILAMENTOUS FUNGI IN SOLID STATE FERMENTATION

In this paper we examined four strains of filamentous fungi *Aspergillus niger* 551, *Aspergillus cervinus* 219, *Rhizopus nigricans* 500 and *Trichoderma reesei* M7-1 for their ability to biosynthesis phytases, phosphatases and accompanying celulase and xylanase enzymes in solid state fermentation. As a carbon source beet pulp, wheat brain and milled bean were used. The time of the culture was 14 days and constant humidity was kept on the 63% level.

All tested strains were able to synthesize dephosphorylating enzymes, celulase and xylanase depending on the strain, carbon source and incubation time. The most effective producer of phytase as well as phosphatase was *A. niger* 551. The medium with beet pulp was the best to produce these enzymes, the highest activity were for phytase 15,20 U g⁻¹ (*A. niger* 551 – 3 day) and for phosphatase 39,35 U g⁻¹ (*T. reesei* M7-1 – 12 day) in these conditions. Wheat brain was the most effective carbon source for xylanase and celulase production. The highest biosynthesis of xylanase and celulase was observed for *R. nigricans* 500 strain, 279,5 U g⁻¹ (3 day) and *T. reesei* M7-1, 12,9 U g⁻¹ (5 day).

Key words: filamentous fungi, phytases, phosphatases, celulases, xylanases, solid state fermentation

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 29.06.2007

STAN FIZJOLOGICZNY DROŹDŹY PIWOWARSKICH W CZASIE FERMENTACJI BRZECZEK SKAŻONYCH MYKOTOKSYNAMI. CZ. 2: DAS I OTA*

Barbara Foszczyńska, Ewelina Dziuba

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Celem pracy było określenie wpływu różnych stężeń diacetoksyscirpenolu (DAS) i ochratoksyny A (OTA) na stan fizjologiczny 4 szczepów drożdży piwowskich w kluczowych momentach fermentacji brzezki słodowej. Zastosowano następujące stężenia toksyn: 5, i 15 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (DAS) oraz 15 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (OTA). Badano m.in.: żywotność i przyrost biomasy drożdży oraz ich siłę zakwaszania. Stwierdzono, że ochratoksyna A nie wpływała na żywotność i witalność badanych szczepów drożdży. Z kolei DAS, wraz ze wzrostem stężenia, hamował przyrost biomasy oraz wpływał niekorzystnie na siłę zakwaszania drożdży. Szczególną wrażliwość na toksynę DAS wykazał szczep S.ca. 13.

Słowa kluczowe: drożdże piwowskie, diacetoksyscirpenol, ochratoksyna A, fermentacja, stan fizjologiczny drożdży

WSTĘP

Wykazana w licznych badaniach biologiczna aktywność mykotoksyn wobec organizmów jednokomórkowych może skutkować ograniczeniem ich funkcji życiowych [Boeira i in. 1999 a i b, 2002, Schappert i Khachatourians 1983]. W przypadku drożdży wykorzystywanych do procesu fermentacji brzezki słodowej wiąże się to m.in. z pogorszeniem ich stanu fizjologicznego. Jak wiadomo, od jakości drożdży piwowskich zależy w dużej mierze przebieg i efekty fermentacji oraz dojrzewania piwa. W pierwszej części pracy [Foszczyńska i Dziuba 2007] badano wpływ toksyny T-2 i zearalenonu na stan fizjologiczny drożdży piwowskich. Stwierdzono, że zearalenon wpływał niekorzystnie na proces namnażania i aktywność metaboliczną drożdży w początkowym

Badania realizowane w ramach projektu badawczego Nr 2 P06T 020 28 finansowanego przez KBN w latach 2005-2007.

Adres do korespondencji – Corresponding author: Barbara Foszczyńska, Katedra Technologii Rolnej i Przechowalnictwa, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław, e-mail: bfoszcz@wnoz.ar.wroc.pl

stadium fermentacji i przy najwyższym stężeniu, tj. $50 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Toksyna T-2 wykazała silniejsze oddziaływanie we wszystkich fazach fermentacji, obniżając żywotność drożdży i siłę zakwaszania. Niniejsza praca jest kontynuacją podjętych badań, a jej przedmiotem było określenie wpływu dwóch innych toksyn: diacetoksiscirpenolu (DAS) i ochratoksyny A na stan fizjologiczny drożdży piwowarskich w kluczowych momentach fermentacji brzezki słodowej.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiałem doświadczalnym były toksyny: diacetoksiscirpenol (DAS) i ochratoksyna A (OTA) zakupione w firmie Sigma Aldrich Sp. z o.o.

Materiał biologiczny stanowiły 4 szczepy drożdży piwowarskich: *S. carlsbergensis* I-S.ca./13, *S. cerevisiae (lager)* 23, *S. cerevisiae* I-S.c./46 oraz *S. cerevisiae* I-S.c./57. Drożdże S.ca. 13 oraz S.c. 46 i 57 pochodziły z kolekcji kultur drobnoustrojów Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie. Szczep S.c.23 został wyizolowany w Zakładzie Technologii Fermentacji Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z 48 godz. hodowli suszonych drożdży piwowarskich Saflager S-23 (Lesaffre Bio-Corporation sp. z o.o.).

Podłożem fermentacyjnym była 12% brzezka słodowa otrzymana ze słodu jasnego typu pilzneńskiego. Brzezkę skażano roztworem mykotoksyny DAS lub OTA w etanolu. Zastosowano następujące stężenia toksyn w brzezce: DAS 5 i $15 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ oraz OTA $15 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Stężenia te wybrano na podstawie wyników skringingowej hodowli badanych szczepów drożdży na podłożu syntetycznym skażonym różnymi dawkami mykotoksyn (publikacja w przygotowaniu). Próbę kontrolną stanowiła brzezka bez toksyny, ale z równoważną w stosunku do wprowadzonego wraz z toksyną ilością alkoholu. Brzezki kontrolne i skażone zaszczipiano w warunkach sterylnych inokulum, osiągając stężenie 20×10^6 j.t.k. $\cdot\text{cm}^{-3}$. Po zaszczipieniu brzezki każdego rodzaju rozdzielano do serii kolb fermentacyjnych (poj. 100 cm^3). Proces fermentacji z udziałem szczepów S.ca. 13 i S.c.23 prowadzono w temperaturze $10\text{--}12^\circ\text{C}$ przez 9 dni, a szczepów S.c.46 i 57 w temperaturze $23\text{--}25^\circ\text{C}$ przez 5 dni.

W trakcie fermentacji pobierano okresowo próby w celu zbadania żywotności i witalności drożdży. Żywotność oznaczano metodą barwienia komórek roztworem błękitu metylenowego [Sami i in. 1994] i przedstawiano jako procentowy udział komórek aktywnych w badanej populacji drożdży. Przyrost biomasy określano poprzez pomiar gęstości optycznej zawiesiny drożdży (spektrofotometr Beckman DU 650; $\lambda=560 \text{ nm}$), a następnie wyznaczenie liczby komórek w 1 cm^3 brzezki z krzywej standardowej właściwej dla danego szczepu (zależność gęstości optycznej od liczby komórek w 1 cm^3). Witalność drożdży oceniano na podstawie testu siły zakwaszania oraz zawartości wewnątrzkomórkowej trehalozy. Oznaczenie siły zakwaszania wykonano zmodyfikowaną metodą Kara i in. [1988]. Zawartość trehalozy w komórkach drożdżowych oznaczono metodą antronową po ekstrakcji kwasem trichlorooctowym [Stewart 1975].

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Żywotność drożdży (z wyjątkiem szczepu S.c. 57), we wszystkich kluczowych fazach fermentacji brzezki nieskażonej, była bardzo dobra ($>95\%$) (tab. 1). Skażenie

brzezki diacetoksycirpenolem spowodowało zwiększenie w populacji udziału komórek nieaktywnych proporcjonalnie do zastosowanego stężenia toksyny. W okresie zarfermentowania największy udział komórek nieaktywnych, w środowisku skażonym najwyższą dawką DAS ($15 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), posiadały szczepy S.c. 13 i S.c. 57. Jednak w miarę postępu fermentacji żywotność wszystkich szczepów drożdży w warunkach silnego skażenia brzezki toksyną DAS ulegała pogorszeniu, osiągając w końcowym stadium fermentacji poziom 71-87%.

Tabela 1. Żywotność drożdży piwowarskich [%] w czasie fermentacji brzeczek zawierających DAS

Table 1. Viability of brewing yeasts [%] during fermentation of worts containing DAS

Szczep drożdży Yeast strain	Stężenie DAS DAS concentration [$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$]	Doba fermentacji Day of fermentation				
		1	3	4	5	9
S.ca. 13	0	96	–	96	–	96
	5	93	–	87	–	78
	15	86	–	89	–	79
S.c. 23	0	98	–	96	–	94
	5	97	–	96	–	89
	15	94	–	88	–	87
S.c. 46	0	99	99	–	98	–
	5	95	89	–	79	–
	15	93	87	–	78	–
S.c. 57	0	90	89	–	77	–
	5	86	76	–	76	–
	15	78	78	–	71	–

W przeciwieństwie do DAS skażenie podłoża fermentacyjnego ochratoksyną A, w ilości $15 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, nie powodowało pogorszenia aktywności fizjologicznej badanych szczepów drożdży piwowarskich. W próbach kontrolnych i skażonych toksyną OTA żywotność drożdży we wszystkich okresach fermentacji była dobra lub bardzo dobra (tab. 2). Jedynie szczep S.c.57, począwszy od etapu fermentacji burzliwej (3 doba), wykazywał gorszą żywotność, co było prawdopodobnie związane z dużą aktywnością fermentacyjną tego szczepu oraz skłonnością do szybkiej flokulacji.

Tabela 2. Żywotność drożdży piwowarskich [%] w czasie fermentacji brzeczek zawierających OTA

Table 2. Viability of brewing yeasts [%] during fermentation of worts containing OTA

Szczep drożdży Yeast strain	Stężenie OTA OTA concentration [$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$]	Doba fermentacji Day of fermentation				
		1	3	4	5	9
S.ca. 13	0	99	–	96	–	98
	15	97	–	96	–	98
S.c. 23	0	92	–	95	–	90
	15	92	–	89	–	90
S.c. 46	0	95	99	–	99	–
	15	97	99	–	98	–
S.c. 57	0	95	85	–	87	–
	15	89	84	–	87	–

Zastosowane w badaniach toksyny w zróżnicowany sposób wpływały na proces namnażania drożdży w czasie fermentacji. Toksyna DAS silnie hamowała przyrost biomasy drożdży już od stężenia $5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (tab. 3). Szczególną wrażliwość na toksynę DAS okazał szczep S.ca. 13. W okresie zafermentowania liczba komórek tego szczepu, niezależnie od dawki toksyny, była taka sama jak w inokulum tj. $2 \times 10^6 \text{ j.t.k}\cdot\text{cm}^{-3}$. Przyrost biomasy S.ca. 13 w skażonym środowisku był hamowany do końca fermentacji, zwłaszcza przy stężeniu $15 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Tak silne skażenie brzezki toksyną DAS było przyczyną osłabionego tempa namnażania się drożdży S.c. 46, które do momentu fazy fermentacji burzliwej zaledwie podwoiły ilość biomasy. Drożdże S.c. 46 wykazały zdolność do reprodukcji w kolejnych dniach fermentacji, jednak pod koniec procesu, liczba komórek tego szczepu była zdecydowanie niższa od próby kontrolnej. Pozostałe dwa szczepy (S.c. 23 oraz S.c. 57) wyróżniały się lepszą zdolnością adaptacji do środowiska zawierającego DAS, ponieważ już w okresie fermentacji burzliwej (odpowiednio 4 lub 3 doba) liczba komórek drożdży w brzezczkach skażonych nieznacznie odbiegała od ilości biomasy wytworzonej w brzezczkach nie skażonych.

Tabela 3. Liczba komórek drożdży piwowskich [$\times 10^7 \text{ j.t.k}\cdot\text{cm}^{-3}$] w czasie fermentacji brzezczek zawierających DAS

Table 3. Brewing yeasts' cell count [$\times 10^7 \text{ c.f.u.}\cdot\text{ml}^{-1}$] during fermentation of worts containing DAS

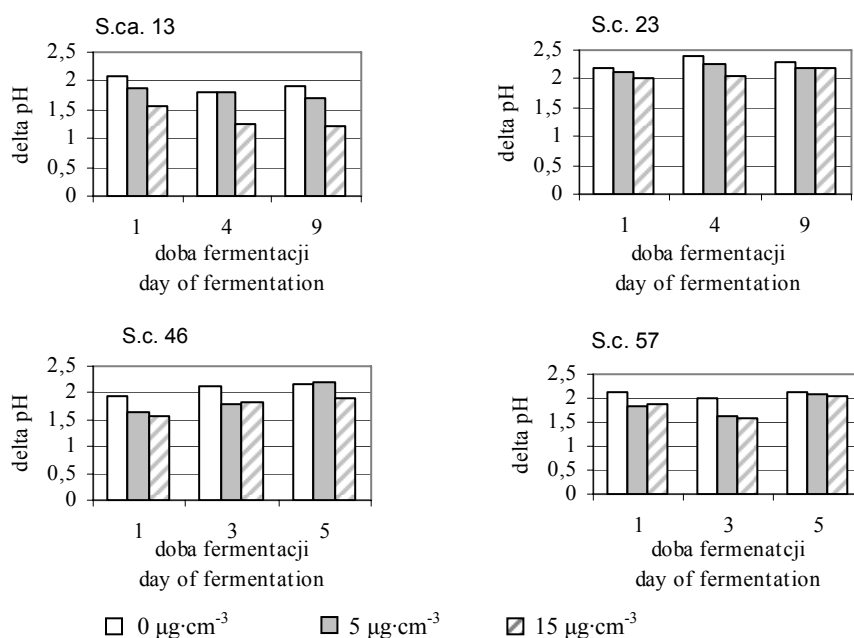
Szczep drożdży Yeast strain	Stężenie DAS DAS concentration [$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$]	Doba fermentacji Day of fermentation				
		1	3	4	5	9
S.ca. 13	0	2,8	–	8,5	–	10,1
	5	2,1	–	3,6	–	6,8
	15	2,1	–	2,4	–	3,2
S.c. 23	0	2,8	–	8,5	–	10,3
	5	2,5	–	7,5	–	9,2
	15	2,4	–	7,7	–	8,3
S.c. 46	0	6,8	9,1	–	9,7	–
	5	3,5	5,5	–	7,5	–
	15	2,3	4,2	–	6,6	–
S.c. 57	0	6,5	8,2	–	8,7	–
	5	6,1	8,3	–	8,7	–
	15	4,2	7,2	–	7,9	–

Ochratoksyna A, w stężeniu $15 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ brzezki, nie wpływała na żywotność komórek i tym samym nie zakłócała rozwoju badanych szczepów drożdży. Wyniki oznaczeń w kolejnych stadiach fermentacji wskazują, że ilość biomasy badanych szczepów drożdży w brzezczkach skażonych OTA była taka sama jak w brzezczkach wolnych od tej toksyny (tab. 4).

W wyniku badań stwierdzono, że toksyna DAS wpłynęła istotnie nie tylko na żywotność komórek, ale także na ich witalność, wyrażoną poprzez test na siłę zakwaszania. Wraz ze wzrostem stężenia toksyny obserwowano obniżenie wartości siły zakwaszania zarówno drożdży dolnej, jak i górnej fermentacji (rys.1). Przy stężeniu DAS $15 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, wszystkie szczepy drożdży pobrane z początkowego i burzliwego stadium fermentacji wykazywały zmniejszoną, w stosunku do prób kontrolnych, zdolność do zużywania dodanej glukozy. Natomiast w końcowej fazie fermentacji siła zakwaszania szczepów S.c. 23 i S.c. 57 ze środowiska zawierającego DAS nie odbiegała znacząco od drożdży fermentujących brzezki.

Tabela 4. Liczba komórek drożdży piwowarskich [$\times 10^7$ j.t.k. \cdot cm^{-3}] w czasie fermentacji brzeczki zawierających OTATable 4. Brewing yeasts' cell count [$\times 10^7$ c.f.u. \cdot ml^{-1}] during fermentation of worts containing OTA

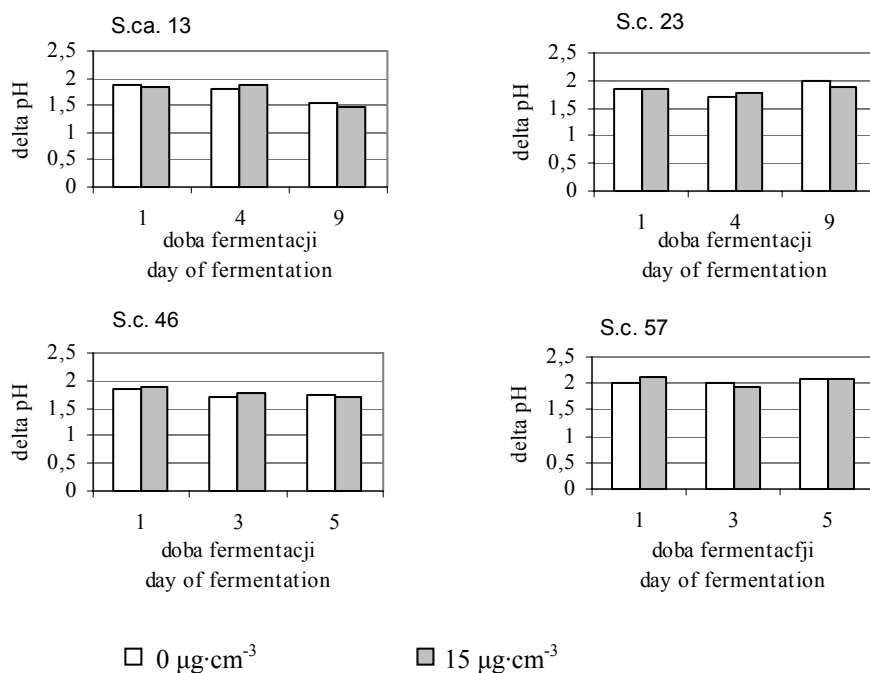
Szczep drożdży Yeast strain	Stężenie OTA OTA concentration [$\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$]	Doba fermentacji Day of fermentation				
		1	3	4	5	9
S.ca. 13	0	3,3	–	8,9	–	9,6
	15	3,3	–	9,0	–	10,0
S.c. 23	0	3,1	–	7,8	–	10,0
	15	3,0	–	7,2	–	9,6
S.c. 46	0	6,8	8,8	–	9,5	–
	15	7,2	9,1	–	9,6	–
S.c. 57	0	6,1	8,0	–	8,7	–
	15	6,2	7,7	–	9,0	–

Rys. 1. Siła zakwaszania drożdży [delta pH] w czasie fermentacji brzeczki zawierających DAS
Fig.1. Acidification power of yeasts during fermentation of worts containing DAS

W odróżnieniu od DAS ochratoksyna A nie pogarszała witalności badanych szczepów drożdży. Drożdże fermentujące brzeczki z dodatkiem OTA ($15 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) cechowały się podobną do prób kontrolnych siłą zakwaszania (rys. 2).

Skażenie brzeczki toksyną DAS wywołało silną reakcję drożdży dolnej fermentacji, które w fazie zafermentowania brzeczki z dodatkiem $5 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ zwiększyły zawartość trehalozy w komórkach S.ca. 13 z 0,5 do 19,2 %, a w komórkach S.c. 23 z 1,2 do 10,1%

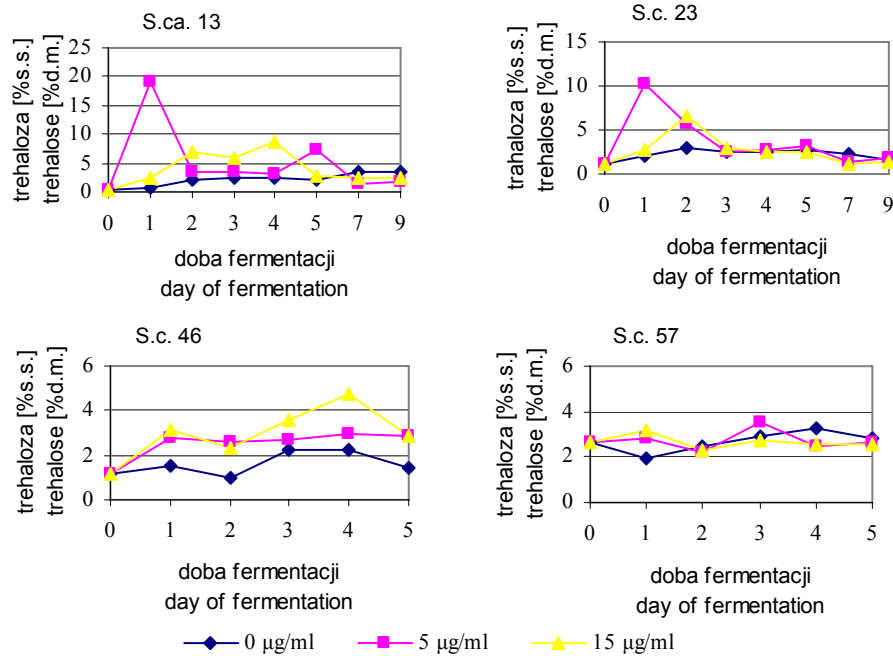
s.s. (rys. 3). W fazie fermentacji burzliwej zawartość trehalozy u obydwu szczepów obniżyła się do poziomu nieco wyższego lub porównywalnego do prób kontrolnych. Najwyższa dawka toksyny DAS, tj. $15 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ spowodowała osłabienie drożdży, ponieważ zwiększenie zawartości trehalozy wewnątrzkomórkowej nastąpiło dopiero w drugim dniu fermentacji.



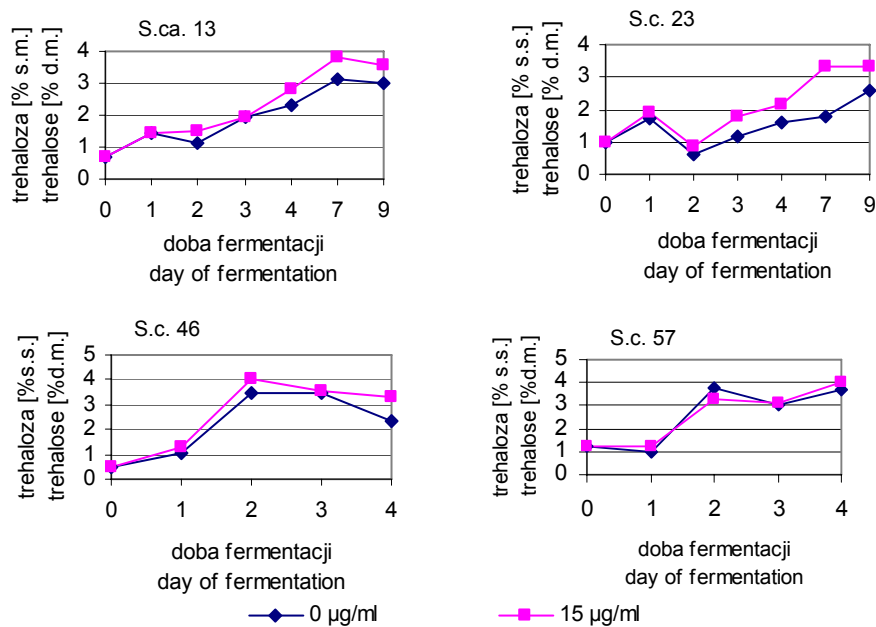
Rys. 2. Siła zakwaszania drożdży [delta pH] w czasie fermentacji brzeczek zawierających OTA
Fig.2. Acidification power of yeasts during fermentation of worts containing OTA

Reakcja drożdży górnej fermentacji na obecność toksyny DAS, badana po 12 godzinach od inokulacji, była mniej widoczna, chociaż odnotowano w porównaniu z próbą kontrolną, nieco wyższy poziom trehalozy w komórkach drożdży fermentujących skażoną brzeczkę (rys. 3). W dalszych etapach fermentacji zawartość trehalozy w tych drożdżach była nieco większa (S.c. 46) lub porównywalna (S.c. 57) do prób kontrolnych.

W przeciwieństwie do DAS ochratoxyna A nie miała istotnego wpływu na syntezę trehalozy przez drożdże dolnej i górnej fermentacji (rys. 4). Niezależnie od obecności czynnika toksycznego, w okresie zafermentowania, nastąpił nieznaczny wzrost stężenia trehalozy w komórkach szczepów S.ca. 13, S.c. 23 i S.c. 46. W miarę postępu fermentacji ilość węglowodanu ochronnego na ogół się zwiększała.



Rys. 3. Zawartość trehalozy w drożdżach w czasie fermentacji brzeczki zawierającej toksynę DAS
 Fig. 3. Trehalose content in yeasts during fermentation of worts containing DAS toxin



Rys. 4. Zawartość trehalozy w drożdżach w czasie fermentacji brzeczki zawierającej toksynę OTA
 Fig. 4. Trehalose content in yeasts during fermentation of worts containing OTA toxin

DYSKUSJA WYNIKÓW

W obu częściach prezentowanej pracy badano żywotność i witalność drożdży piwowarskich w kluczowych momentach fermentacji brzezki słodowej poddanej skażeniu wtórnymi metabolitami grzybów strzępkowych. Do skażenia brzezki zastosowano trzy toksyny (DAS, T-2, ZEA) wytwarzane przez pleśnie z rodzaju *Fusarium*, postrzeżanego jako największe zagrożenie mikrobiologiczne dla procesu słodowania jęczmienia browarnego [Flanningan 1987, Schwarz i in. 1995]. Z kolei ochratoksyna A należy do grupy toksyn najczęściej występujących w zbożach, które są uprawiane w warunkach klimatu umiarkowanego.

Przeprowadzone badania wykazały niekorzystny wpływ mykotoksyn na żywotność i witalność komórek drożdży piwowarskich fermentujących brzezkę słodową, przy czym efekt zależny był od rodzaju toksyny i jej stężenia, a także od indywidualnej wrażliwości danego szczepu drożdży. Spośród zastosowanych mykotoksyn największą inhibicję wzrostu drożdży we wszystkich fazach fermentacji powodowała toksyna T-2 [Foszczyńska i Dziuba 2007] i diacetoksyscirpenol (DAS). Z badań przeprowadzonych przez innych autorów [Boeira i in. 1999 a i b, Perkowski 2000, Whitehead i Flanningan B. 1989] wynika, że toksyna T-2 najsilniej opóźnia wzrost komórek, DAS działa w mniejszym stopniu, natomiast obecność DON, który jest łatwo rozpuszczalny w brzezce fermentacyjnej, ma najmniejszy wpływ. W badaniach własnych ochratoksyna A nie wykazała żadnego wpływu na stan fizjologiczny drożdży piwowarskich, a zearalenon zakłócał przebieg namnażania tylko w fazie zafermentowania brzezki. Możliwe, że drożdże w okresie adaptacji w środowisku zawierającym OTA lub ZEA były zdolne do uruchomienia mechanizmu obronnego, dzięki któremu nastąpił dalszy rozwój biomasy. Okazuje się bowiem, że zearalenon może być transformowany przez niektóre gatunki drożdży i pleśni do dwóch izomerów: α -zearalanolu (0,5%) i β -zearalanolu (95%) [Boeira i in. 1999 a i b].

Niewątpliwie, zakłócona zdolność drożdży do reprodukcji w środowisku zawierającym czynniki inhibujące ma duże znaczenie dla przebiegu fermentacji brzezki, tym bardziej że nawet przy braku widocznych oznak słabszej żywotności komórek można otrzymać złe wyniki fermentacji. Jak podaje Latus-Ziętkiewicz [1998], gęstwa o dużej liczbie żywych komórek może cechować się słabą witalnością, przejawiającą się spowolnioną fermentacją oraz słabym odfermentowaniem brzezki i powstawaniem za dużej ilości niepożądanych produktów ubocznych. Dlatego też w ostatnim czasie przy ocenie stanu fizjologicznego drożdży zwraca się szczególną uwagę na ich witalność, czyli zdolność komórek do przeżycia stresu i zachowania pożądanej aktywności fermentacyjnej.

Jednym ze sposobów określenia witalności drożdży jest przeprowadzenie testu na siłę zakwaszenia, który polega na pomiarze spadku pH w zawiesinie drożdży przed i po dodaniu do niej 20% roztworu glukozy [Baca i in. 2000, Kara i in. 1988]. Metoda ta jest wskaźnikiem aktywności metabolicznej drożdży i pozwala przewidywać przebieg fermentacji. W badaniach własnych obserwowano wpływ toksyn na ten parametr. Silniejsze toksyny (T-2 i DAS) zmniejszały proporcjonalnie do stężenia siłę zakwaszenia badanych drożdży w kolejnych etapach fermentacji, prawdopodobnie poprzez hamowanie wzrostu i aktywności metabolicznej komórek. Natomiast ochratoksyna A i zearalenon osłabiały funkcje komórek jedynie w fazie zafermentowania brzezki.

Autorzy niniejszej pracy założyli, że wprowadzenie mykotoksyn do podłoża fermentacyjnego wywoła u drożdży zjawisko stresu chemicznego. Opisane powyżej efekty

związane z żywotnością i witalnością drożdży wskazują na jego wystąpienie. Dodatkowym potwierdzeniem tej tezy jest reakcja drożdży dolnej fermentacji polegająca na intensyfikacji akumulacji trehalozy w momencie zafermentowania. Zdaniem wielu autorów [Latus-Ziętkiewicz 1998, Majara i wsp. 1996 a i b] wzrost stężenia trehalozy wskazuje na czynnik stresujący u drożdży prowadzących proces fermentacji. Metabolizm trehalozy u *S. cerevisiae* jest powiązany z wieloma funkcjami komórki, jej wzrostu i cykli [Samokhlov i wsp. 2004]. Wykazano np., że drożdże transportując trehalozę z membrany cytoplazmatycznej do ściany komórkowej zmniejszają jej przepuszczalność, a tym samym ograniczają wnikanie szkodliwych substancji do wnętrza komórki. Prawdopodobnie tego typu mechanizm wystąpił u badanych szczepów drożdży. Było to szczególnie widoczne w odniesieniu do szczepów dolnej fermentacji, które w środowisku skażonym toksyną T-2 (na poziomie 5; 10 i 15 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) i DAS (5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) zwiększały w fazie zafermentowania zawartość węglowodanu ochronnego w komórkach. Z kolei dawka DAS 15 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ prawdopodobnie bardzo osłabiła komórki drożdży S.ca.13 (niższa zawartość trehalozy w pierwszym dniu w porównaniu ze stężeniem 5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), które nie były w stanie obronić się przed tak dużym stężeniem czynnika skażającego. W efekcie obserwowano bardzo słaby przyrost biomasy tego szczepu.

Ze względu na pracochłonność zastosowanej metody zawartość trehalozy w komórkach drożdży oznaczano w momencie inokulacji oraz po upływie 12–15 godzin. Prawdopodobnie z tego powodu nie zaobserwowano reakcji drożdży górnej fermentacji na obecność czynnika skażającego podłoże, nawet tak silnego jak toksyna T-2 czy DAS. Jest oczywiste, że w warunkach fermentacji górnej metabolizm drożdży przebiega znacznie szybciej niż podczas fermentacji dolnej. Niewątpliwie korzystniej byłoby monitorować stan fizjologiczny drożdży w krótszych odstępach czasowych, zwłaszcza na początku fermentacji. Nie było to jednak możliwe z powodu szerokiego zakresu zaplanowanych zadań badawczych.

PODSUMOWANIE

Uzyskane wyniki badań dają podstawę do stwierdzenia, że mykotoksyny wpływały niekorzystnie na stan fizjologiczny drożdży w kluczowych momentach fermentacji. Najsilniejszym oddziaływaniem charakteryzowały się toksyna T-2 [Foszczyńska i Dziuba 2007] i DAS, szczególnie wobec drożdży *S. carlsbergensis* 13 i *S. cerevisiae* 46. Obniżona żywotność i witalność drożdży, zwłaszcza w fazie zafermentowania oraz fermentacji burzliwej, może rzutować na zdolność komórek do utylizacji składników brzezki oraz wydzielanie produktów metabolizmu ważnych dla jakości piwa. Tego typu zagadnieniom poświęcona będzie kolejna część badań.

PIŚMIENNICTWO

- Baca E., Michałowska D., Salamon M., 2000. Ocena przydatności drożdży piwowarskich w aktualnych warunkach technologicznych. Prace Instyt. i Laborat. Bad. Przem. Spożyw., t. LV, 96-111.
- Boiera L.S., Bryce J.H., Steward G.G., Flanningan B., 1999a. Inhibitory effect of Fusarium mycotoxins on growth of brewing yeasts. 1. Zearalenone and fumonisin B1, J. Inst. Brew., 105, 366-375.

- Boiera L. S., Bryce J. H., Stewart G. G., Flanningan B., 1999b. Inhibitory effect of *Fusarium* mycotoxins on growth of brewing yeast. 2. Deoxynivalenol and nivalenol. *J. Inst. Brew.*, 105, 376-383.
- Boeira L.S., Bryce J. H., Stewart G. G., Flanningan B., 2002. Influence of cultural conditions on sensitivity of brewing yeasts growth to *Fusarium* mycotoxins zearalenone, deoxynivalenol and fumonisin B₁. *Internat. Biodeterioration & Biodegradation*, 50, 69-81.
- Foszczyńska B., Dziuba E., 2007. Stan fizjologiczny drożdży piwowarskich w czasie fermentacji brzeczek skażonych mykotoksynami. Cz.I: T-2 i ZEA. *Acta Scientiarum Polonorum. Biotechnologia*, 6(1), 3-12.
- Flanningan B., 1987. The microflora of barley and malt, in: *Brewing Microbiology* ed. Priest F.G., Campbell I., Elsevier Applied Science, London and New York, 83-120.
- Kara B.V., Simpson W.J., Hammond J.R.M., 1988. Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. *J. Inst. Brew.*, 94, 153-158.
- Latus-Ziętkiewicz D., 1998. Gospodarka drożdżami, a jakość piwa (1). *Przem. Ferm. Ow. Warz.*, 10, 31-33.
- Majara M., O'Connor-Cox E.S.C., Axcell B.C., 1996. Trehalose – a stress protectant and stress indicator compound for yeast exposed to adverse conditions. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 54, 221-227.
- Majara M., O'Connor-Cox E.S.C., Axcell B.C., 1996. Trehalose – an osmoprotectant and stress indicator compound in high and very high gravity brewing. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 54, 149-154.
- Perkowski J., 2000. Mikotoksyny w surowcach piwowarskich i w piwie oraz w czasie jego otrzymywania. *Przem. Ferm. Ow. Warz.*, 11, 14-16.
- Sami M., Ikeda M., Yabuuchi S., 1994. Evaluation of alkaline methylene blue staining method for yeast activity determination. *J. Ferment. Bioeng.*, 78, 212-216.
- Samokhlov V.A., Mel'nikov G.V., Ignatov V.V., 2004. The role of trehalose and glycogen in the survival of aging *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Micobiology*, 73, 378-382.
- Schappert K.T., Khachatourians G.G., 1983. Effects of fusariotoxin T-2 on *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces carlsbergensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 862-867.
- Schwarz P.B., Casper H.H., Beattie S., 1995. Fate and development of naturally occurring *Fusarium* mycotoxins during malting and brewing. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 53, 121-127.
- Steward P.R., 1975. Analytical methods for yeasts, *Methods Cell Biol*, 12, 111-147.
- Whitehead M.P., Flanningan B., 1989, The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol and yeast growth and fermentation. *J. Inst. Brew.*, 95, 411-413.

PHYSIOLOGICAL STATUS OF BREWING YEASTS DURING FERMENTATION OF WORTS CONTAMINATED WITH MYCOTOXINS. P.2: DAS AND OTA

Summary. The aim of this study was to determine the influence of different concentrations of diacetoxiscirpenol (DAS) and ochratoxin A (OTA) on physiological status of 4 brewing yeast strains during wort fermentation. DAS toxin was used at concentration of 5 i 15 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ and OTA of 15 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. The viability, biomass growth and acidification power of yeasts were enhanced. It was stated that ochratoxin A had no influence on viability and vitality of tested yeast strains. DAS caused, according to the concentration applied, the inhibition of biomass growth and had unfavourably influence on acidification power of yeasts. The most sensitive to DAS toxin was strain of S.ca. 13.

Key words: brewing yeasts, diacetoxiscirpenol, ochratoxin A, fermentation, physiological status of yeasts

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 29.06.2007

SPIS TREŚCI CONTENTS

Urszula Złotek, Wiesław Wójcik

- Wybrane aspekty nabywania u roślin odporności typu SAR..... 3
Some aspects of mechanisms of acquiring immunity in plants

Anita Rywińska, Danuta Witkowska, Michał Piegza, Małgorzata Jarosz, Justyna Salamon

- Biosynteza fitaz, fosfataz oraz celulaz i ksylanaz w hodowlach
grzybów strzępkowych w podłożu stałym..... 13
Biosynthesis of phytases, phosphatases, celulases and xylanases
by filamentous fungi in solid state fermentation

Barbara Foszczyńska, Ewelina Dziuba

- Stan fizjologiczny drożdży piwowarskich w czasie fermentacji
brzeczek skażonych mykotoksynami. Cz. 2: DAS i OTA..... 25
Physiological status of brewing yeasts during fermentation
of worts contaminated with mycotoxins. P.2: DAS and OTA