



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Judyta Strakowska

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Stypendystka projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Analiza kompleksu enzymów litycznych i lakaz u grzybów z rodzaju *Trichoderma* dla potrzeb produkcji biopaliw, kompostowania odpadów organicznych i innych zastosowań w ochronie środowiska

Grzyby z rodzaju *Trichoderma*, będące materiałem badawczym w niniejszej dysertacji, charakteryzują się szerokim występowaniem we wszystkich strefach klimatycznych, a ich najczęstszym siedliskiem jest gleba i próchniejące drewno. Występują na obszarach rolniczych, leśnych, preriach a nawet w słonych bagnach. Powodują gnicie drewna i rozkład obumarłych części roślin. Wykazują niezwykle pożądane działanie nadpasożytnicze wobec grzybowych patogenów roślin np. z rodzaju *Fusarium* oraz zwiększają odporność roślin na patogeny poprzez stymulację syntezy roślinnych elicitorów.

Grzyby te posiadają niezwykle rozbudowany aparat enzymatyczny. W szczególności dotyczy to enzymów wchodzących w skład tak zwanego kompleksu enzymów litycznych degradujących ściany komórkowe CWDEs (ang. Cell Wall Degrading Enzymes). Należą tu enzymy takie jak: celulazy, chitynazy, ksylanazy, β -glukanazy, proteazy, pektynazy. Celulazy rozkładają polimer celulozowy do pojedynczych cząsteczek glukozy, co może być wykorzystane w produkcji biopaliw.

Ksylanazy hydrolizują jeden z istotniejszych składników drewna czyli ksylan, a produkty powstałe w tej reakcji mogą służyć do produkcji pasz, paliw, żywności i chemikaliów.

Interesującą i obiecującą grupą enzymów są lakazy, będące oksydoreduktazami. Ze względu na ich niską specyficzność substratową, są w stanie prowadzić reakcje utleniania wielu różnych związków. W tym związków estrogenopochodnych, które znajdują się w ściekach gdzie dostają się wraz z moczem kobiet stosujących antykoncepcję hormonalną. Pochodne estrogeny w wodzie są bardzo trudne do usunięcia. Powodują u zwierząt wodnych

choroby związane z zaburzeniami rozwoju układu płciowego takie jak: spadek jakości nasienia, rak prostaty czy jąder.

Ponadto lakazy biorą udział w unieczynnianiu zearalenonu, mikotoksyny o właściwościach estrogennych produkowanej przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, będącego patogenem roślin uprawnych.

W przemyśle (np. papierniczym, włókienniczym, spożywczym, chemicznym) do produkcji enzymów wykorzystuje się zmutowane szczepy *Trichoderma*. Głównie są to mutanty tropikalnego gatunku *Trichoderma reesei* np. mutant QM 9414 wydajnie produkujący celulazy. Na skutek prowadzonych badań na izolatach różnych gatunków *Trichoderma* pozyskanych głównie z próchniejącego drewna z parków i lasów województwa wielkopolskiego oraz innych regionów Polski odkryto, iż niektóre izolaty są dobrą alternatywą dla zmutowanych szczepów. W analizach aktywności celulolitycznej pewne izolaty ze środowiska naturalnego wykazywały wydajność w produkcji celulaz porównywalną lub nawet wyższą niż referencyjny zmutowany szczep *Trichoderma reesei* QM 9414, będący wydajnym producentem celulaz.

Zakłada się, iż można znaleźć w środowisku naturalnym taki gatunek z rodzaju *Trichoderma*, który będzie wydajnie produkował jedną albo kilka grup enzymów na wydajnym poziomie bez konieczności poddawania go mutagenizacji. Jak również przypuszcza się, że poznanie dogłębne genów kodujących poszczególne enzymy oraz badania prowadzone bezpośrednio na tych enzymach jako białkach wyizolowanych z płynu pochodzącego przyczynią się do optymalizacji wydajnej produkcji enzymów na cele przemysłowe.

Celem pracy jest wyselekcjonowanie bezpiecznych i stabilnych genetycznie izolatów grzybów z rodzaju *Trichoderma*, pochodzących ze środowiska naturalnego, nie będących mutantami, a mimo to produkujących wydajnie wybrane grupy enzymów (celulazy, ksylanazy, β -glukanazy, mutanazy, lakazy) dla potrzeb ochrony środowiska, zagospodarowania odpadów organicznych, produkcji biopaliw, rolnictwa, poprawy jakości żywności pod względem zawartości mikotoksyn oraz oczyszczania ścieków ze związków estrogenopochodnych.

Poszczególne etapy badań obejmują: identyfikację molekularną (na podstawie fragmentów genów ITS4-5 i *tef* 1 α) izolatów grzybów z rodzaju *Trichoderma* pozyskanych z parków i lasów Wielkopolski i innych regionów Polski. Sekwencjonowanie genów kodujących celulazy, ksylanazy, glukanazy, lakazy, mutanazy. Następnie analiza aktywności poszczególnych grup enzymów i analiza molekularna genów kodujących te grupy enzymów. Kolejne etapy prac obejmą izolację białek (enzymów) i analizy proteomiczne – dwukierunkowy rozdział elektroforetyczny białek oraz ich analiza metodami spektrometrii MAS.

Wyniki z powyższych analiz umożliwią wyodrębnienie najwydajniejszych gatunków lub izolatów grzybów z rodzaju *Trichoderma* pod względem produkcji enzymów przydatnych do taniej i wydajnej produkcji biopaliw z odpadów organicznych (bez redukcji areałów upraw roślin żywnościowych), kompostowania odpadów organicznych oraz ewentualnych innych celów przemysłowych.

Wyselekcjonowanie bezpiecznych, stabilnych genetycznie i zarazem wykazujących wysoką aktywność celulolityczną, pochodzących ze środowiska naturalnego izolatów z rodzaju *Trichoderma*, daje obiecującą perspektywę wydajnego, taniego i ekologicznego wytwarzania biopaliw z odpadów organicznych co jednocześnie stanowi rozwiązanie dla zagospodarowania odpadów organicznych z gospodarstw domowych, przemysłu drzewnego czy przetwórstwa owocowo-warzywnego. Mianowicie zdolność do rozkładu biomasy celulozowej do glukozy może być wykorzystana do produkcji biopaliw z organicznych surowców odpadowych takich jak: ścinki drewna, resztki poźniwne czy inne odpady organiczne. Grzyby z rodzaju *Trichoderma* mogą być również wykorzystane dzięki wydajnej syntezie celulaz do kompostowania odpadów organicznych. Są to niezwykle obiecujące rozwiązania przyczyniające się do ochrony środowiska.

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* są ponadto rezerwuarem mutanaz, enzymów rozkładających glukany – wielocukry niezbędne bakteriom *Streptococcus mutans* do zasiedlania płytki nazębnej i bytowania na niej, co w konsekwencji prowadzi do próchnicy jamy ustnej. Ze względu na swój wieloaspektowy charakter, wyniki realizowanej pracy doktorskiej mogą mieć duże znaczenie gospodarcze. Istnieje wiele możliwości ich potencjalnego zastosowania w województwie wielkopolskim. Wyniki te dają szansę na wprowadzenie innowacyjnych rozwiązań w różnych gałęziach szeroko pojmowanej ochrony środowiska.

Uzyskane wyniki mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w:

- oczyszczaniu ścieków ze związków estrogenopochodnych,
- w rolnictwie – do ochrony roślin uprawnych przed grzybowymi patogenami,
- do poprawy jakości żywności oraz pasz poprzez zmniejszenie poziomu mykotoksyn ze szczególnym uwzględnieniem zearalenonu,
- produkcji biopaliw,
- do kompostowania odpadów organicznych z przemysłu spożywczego i przetwórstwa drzewnego,
- do produkcji past do zębów skutecznie chroniącymi przed bakteriami próchnicznymi *Streptococcus mutans*.

Z racji, iż grzyby z rodzaju *Trichoderma* są wydajnym producentem wielu grup enzymów przydatnych w różnych gałęziach przemysłu i mających szerokie zastosowanie,

wyniki uzyskane w doktoracie dotyczące właśnie tych enzymów odnajdują wiele możliwości zastosowań w województwie wielkopolskim.

W zależności od tego, jaka to jest grupa enzymów, są to następujące możliwości innowacyjnego wykorzystania w rozwoju gałęzi wielkopolskiej gospodarki związanych z przemysłem i ochroną środowiska:

Reasumując, badania nad poszczególnymi grupami enzymów produkowanych przez grzyby z rodzaju *Trichoderma*, które są prowadzone w ramach tego doktoratu mogą się przyczynić do rozwoju wielu gałęzi gospodarki województwa wielkopolskiego. Są szansą na wprowadzenie wielu innowacji. Dają perspektywę wdrożenia wyników w ochronie środowiska, do zagospodarowania odpadów organicznych, produkcji biopaliw, ochrony roślin i oczyszczaniu ścieków. Izolaty wydajnie produkujące enzymy mogą również zostać opatentowane. Całościowo niniejsza praca może doprowadzić do zacieśnienia współpracy i przepływu informacji między światem nauki, przemysłem, ochroną środowiska i biznesem. Realnie jawi się również współpraca w tym temacie z placówkami zagranicznymi.