A *Lentinus edodes* (Shiitake) micélium növekedésének és extracelluláris enzimrendszerének vizsgálata

Doktori értekezés

Készítette:

Hatvani Nóra

molekuláris biológia és biotechnológia ágazatú biológus

Témavezető:

Dr. Mécs Imre

osztályvezető tudományos főmunkatárs, ny. egyetemi docens

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézete

Szeged, 2002.

TARTALOMJEGYZÉK

1. A *Lentinus edodes* biotechnológiai jelentősége 1

2. A micélium növekedésével kapcsolatos vizsgálatok 3

2.1. Bevezetés 3

2.2. Anyagok és módszerek 3

2.2.1. Táptalajok 3

2.2.1.1. A szervetlen ionok hatásának vizsgálatánál használt táptalajok 3

2.2.1.2. A különböző táptalajkomponensek hatásának vizsgálatánál használt táptalajok 4

2.2.1.3. Nehézfémek növekedésgátló hatásának vizsgálatánál használt táptalajok 4

2.2.1.4. A táptalajok sterilizálása 4

2.2.2. A micélium növekedésének mérése és az adatok értékelése 4

2.2.3. Anyagok 5

2.3. Eredmények 6

2.3.1. A szervetlen ionok hatása a micélium növekedésére 6

2.3.2. A különböző táptalajkomponensek hatása a növekedésre 10

2.3.3. Nehézfémek növekedésgátló hatása 13

2.4. Az eredmények értékelése 13

2.4.1. A szervetlen ionok hatása a növekedésre 13

2.4.2. A különböző táptalajkomponensek hatása a növekedésre 14

2.4.3. Nehézfémek növekedésgátló hatása 15

3. Az extracelluláris enzimrendszer vizsgálata 17

3.1. Bevezetés 17

3.2. Célkitűzések 21

3.2.1. Enzimtermelés a sörgyártás során keletkező maláta melléktermékén 21

3.2.2. *Trichoderma* metabolitok hatása az enzimtermelésre 22

3.2.3. Az enzimatikus folyamatok tápanyagfüggése 23

3.2.4. Nehézfémek hatása az enzimtermelésre 24

3.3. Anyagok és módszerek 24

3.3.1. Enzimtermelés a sörgyártás során keletkező maláta melléktermékén 24

3.3.2. *Trichoderma* metabolitok hatása az enzimtermelésre 27

3.3.3. Az enzimatikus folyamatok tápanyagfüggése 29

3.3.4. Nehézfémek hatása az enzimtermelésre 30

3.3.5. Az extracelluláris enzimaktivitások mérése 31

3.3.6. Az adatok statisztikai analízise 31

3.3.7. Anyagok 31

3.4. Eredmények és értékelésük 32

3.4.1. Enzimtermelés a sörgyártás során keletkező maláta melléktermékén 32

3.4.1.1. Eredmények 32

3.4.1.2. Az eredmények értékelése 34

3.4.2. *Trichoderma* metabolitok hatása az enzimtermelésre 35
3.4.2.1. Eredmények 35
3.4.2.2. Az eredmények értékelése 37
3.4.3. Az enzimatikus folyamatok tápanyagfüggése 38
3.4.3.1. Eredmények 38
3.4.3.2. Az eredmények értékelése 45
3.4.4. Nehézfémek hatása az enzimtermelésre 48
3.4.4.1. Eredmények 48
3.4.4.2. Az eredmények értékelése 49

4. Összefoglalás 50

5. Rövidítések jegyzéke 52

6. Irodalomjegyzék 53

7. Köszönetnyilvánítás 63

8. Saját közlemények jegyzéke 64

9. Summary 67

1. A *Lentinus edodes* biotechnológiai jelentősége

A különböző gombafajok biotechnológiai alkalmazása rendkívül széles körű. Ezt elsősorban az általuk termelt számos értékes primer és szekunder metabolit gyógyszer- és élelmiszeripari felhasználása indokolja, de ezentúl egyre nagyobb jelentőséggel bírnak egyéb ipari és környezetvédelmi alkalmazásaik is (Wainwright 1992).

Az ehető gombáknak nemcsak különleges ízük, hanem előnyös tápanyag-összetételük miatt is igen nagy táplálkozás-élettani jelentőségük van. Kedvező élettani hatásuk egyrészt az alacsony lipid- és kalóriatartalomnak és a magas rostanyag-, D és B vitamintartalomnak, másrészt a bennük megtalálható számos gyógyhatású anyagnak tulajdonítható (Mizuno 1995).

A Shiitake gomba (*Lentinus edodes, Pleurotaceae, Agaricales*) a második legnépszerűbb ehető gomba a világpiacon. Természetes körülmények között olyan elhalt lombhullató fák rönkjein nő, mint a tölgy, a gesztenye, a gyertyán vagy a távol-keleti *shii* nevű fa, melyről japán nevét kapta (Wainwright 1992). Ezt a gombát a távol-keleti orvostudomány évszázadok óta elixírként tartja számon. A gomba termőtestéből igen sokféle élettani hatású anyag izolálható, ezek elsősorban az immunrendszert, a szervezet általános védekezését és homeosztázist fenntartó képességét erősítik, de vannak köztük közvetlen antimikrobiális hatással rendelkező vegyületek is (Jong és Birmingham 1993). Az antivirális és tumornövekedést gátló hatás már évtizedek óta ismert (Chihara és mtsai 1969; Takehara és mtsai 1979). A hatóanyagok egy része nemcsak a termőtestben, hanem a micéliumban, illetve annak tápközegében is megtalálható, akár folyadékkultúrában (Lelik és mtsai 1997; Hatvani 2001), akár szilárd táptalajon (Suzuki és mtsai 1979; Hibino és mtsai 1994; Yamamoto és mtsai 1997) növesztve a micéliumot.

A gombák egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy képesek egyszerű és bonyolult összetételű polimer molekulák lebontására, az esetek nagy részében szilárd fázison növekedve is, így a természetben nagy mennyiségben előforduló polimerek (keményítő, cellulóz, cellobióz, pektin stb.) degradációjában és ezáltal az anyag- és energiaforgalomban igen fontos szerepet töltenek be (Wainwright 1992; Leonowicz és mtsai 1999). A fakorhasztó gombák természetes táptalaja a faanyag. A *L. edodes* a faanyag fehér színű korhadását okozó gombák (white rot fungi, WRF) közé tartozik, rendelkezik az ennek hátterében álló biokémiai folyamatokhoz szükséges extracelluláris enzimrendszerrel (Leatham 1985). A WRF csoportba tartozó fajok ennek a speciális enzimrendszernek a segítségével a lignin lebontására is képesek, mely a cellulóznál sokkal ellenállóbb, nehezebben lebontható polimer (→3.1.). Az

enzimrendszer működéséhez aspecificitásának köszönhetően ipari és környezetvédelmi biotechnológiai eljárások kapcsolhatók, ebből adódnak a *L. edodes* egyéb biotechnológiai alkalmazási lehetőségei a gyógyszer- és élelmiszeripar területén kívül.

A *L. edodes* rendelkezik a GRAS (Generally Regarded As Safe) minősítéssel (Pariza és Foster 1983), azaz bizonyítottan nincs semmilyen egészségkárosító hatása, így az általa termelt bármely enzim vagy egyéb metabolit használható az élelmiszeriparban.

A Shiitake gomba kereskedelmi célú termesztése során felhasznált inokulum, valamint a micélium által termelt értékes metabolitok termelése szempontjából a biomassza ipari mennyiségű előállítása nagy jelentőséggel bír. Ehhez kapcsolódik a témában végzett vizsgálataink első csoportja (**2. fejezet**).

Napjainkra a környezetvédelmi szempontok az ipar minden területén elsődlegessé váltak. Az ehhez kapcsolódó biotechnológiai kutatások legfontosabb célja hatékony módszerek kidolgozása a környezetszennyezések biológiai úton történő felszámolására. A WRF csoportba tartozó fajok enzimrendszerének vizsgálatára azért van szükség, mert az alkalmas lehet bioremediációs célokra olyan esetekben, amikor más eljárások nem alkalmazhatók kellő hatékonysággal. Kísérleteink másik része a *L. edodes* extracelluláris enzimrendszerének vizsgálatára irányult (**3. fejezet**).

2. A micélium növekedésével kapcsolatos vizsgálatok

2.1. Bevezetés

Amint azt az 1. fejezetben említettük, a Shiitake gomba antimikrobiális hatóanyagainak egy része nemcsak a termőtestben, hanem a micéliumban is megtalálható. A micélium nagy mennyiségben történő termelésének tanulmányozására egyrészt ezen anyagok, másrészt az ipari szintű gombatermesztéshez használt olcsó inokulum előállítása miatt van szükség. A micélium termelésére használt táptalaj összetételének optimalizálására irányuló kísérleteink során (1) szervetlen ionoknak, (2) különböző szén- és nitrogénforrásoknak, valamint (3) bizonyos nehézfémeknek a micélium növekedésére gyakorolt hatását vizsgáltuk.

2.2. Anyagok és módszerek

2.2.1. Táptalajok

2.2.1.1. A szervetlen ionok hatásának vizsgálatánál használt táptalajok

A szervetlen ionok növekedésgátló hatásásnak meghatározása során alaptáptalajként élesztőextraktummal kiegészített glükózos Sabouraud agar táptalajt (Odds 1991) használtunk, mely 40 g/l glükózt, 10 g/l peptont, 2 g/l élesztőextraktumot és 30 g/l agarat tartalmazott. 11-féle szervetlen só ($NaNO_3$, KNO_3, Na_2SO_4, K_2SO_4, NaH_2PO_4, KH_2PO_4, NaCl, KCl, NH_4Cl, $NaNO_2$, KNO_2) hatását vizsgáltuk, ezeket a 2/1-3. táblázatban és a 2/1-2. ábrán feltüntetett koncentrációkban, az autoklávozás előtt adtuk az alaptáptalajhoz. Kivételt képez ez alól az a kísérlet, amikor a szükséges nitritkoncentrációt sterilre szűrt nitrit törzsoldat (1.45 M) megfelelő mennyiségének a sterilizált, majd 40 °C-ra lehűtött táptalajhoz az agarlemezek kiöntése előtt történő hozzáadásával, illetve a kész táptalaj felületén történő szélesztésével értük el.

Annak eldöntésére, hogy a szervetlen ionoknál tapasztalt növekedésgátlás tulajdonítható -e az ozmotikus hatásnak, melyet a viszonylag magas ionkoncentráció okozhat, a micéliumot 1-20 g/l polietilén-glikol 20 000 (PEG) tartalmú táptalajon növesztettük.

Az aszkorbinsavas táptalaj készítésekor az aszkorbinsavat autoklávozás után, a 40 °C-ra lehűtött táptalajhoz adtuk hozzá sterilre szűrt törzsoldat (20 g/l, pH 6.5) formájában, 0.3 g/l

végső koncentrációban. A teaextraktumot tartalmazó táptalaj a következőképpen készült: 1 db teafiltert (Lipton Yellow Label) 100 ml ioncserélt vízben 15 percig 100 °C-on áztattunk, ezt az extraktumot a glükózos Sabouraud táptalaj 10-szeres hígításban tartalmazta.

A micélium növekedése során fellépő savasodás tanulmányozására összeállított táptalaj 0.03 g/l fenolvörös indikátort és 3 g/l keményítőt tartalmazott. Ennél a táptalajnál a pH-t 8.0-ra, az összes többi esetben 6.5-re állítottuk be az autoklávozás előtt.

2.2.1.2. A különböző táptalajkomponensek hatásának vizsgálatánál használt táptalajok

A táptalaj összetételének optimalizálásával kapcsolatos kísérletek során használt táptalajok 3 g/l agarat és a 2/4-9. táblázatban felsorolt komponenseket tartalmazták. A "tölgyfaforgács" alatt kb. 0.5 cm-es forgácsdarabok és fűrészpor keverékét értjük. A szalmát kb. 0.5 cm nagyságú darabokra vágva adtuk a táptalajhoz.

2.2.1.3. Nehézfémek növekedésgátló hatásának vizsgálatánál használt táptalajok

A nehézfémek növekedésre gyakorolt hatását a táptalaj-optimalizálási kísérletek eredményei (→2.3.2.) alapján kedvezőnek bizonyult, keményítőt (3 g/l) és malátaextraktumot (15 g/l) tartalmazó táptalajon vizsgáltuk. A táptalajhoz annak sterilizálása előtt 9-féle nehézfémsót ($Cd(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, $HgCl_2$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, $Pb(NO_3)_2$ és $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) adtunk hozzá egyenként, 0.005-6 mM koncentráció-tartományban.

2.2.1.4. A táptalajok sterilizálása

A táptalajokat minden kísérletsorozatban autoklávozással sterilizáltuk, 115 °C-on 35 percig, illetve a forgácsot vagy szalmát tartalmazóakat 50 percig.

2.2.2. A micélium növekedésének mérése és az adatok értékelése

Steril dugófúró segítségével 6 mm átmérőjű, micéliummal borított agarkorongokat vágtunk ki Sabouraud agarlemezen növekvő *L. edodes* telepek széléről, és a különböző összetételű táptalajokat ezekkel oltottuk le. Szobahőmérsékleten 11 napig inkubáltuk a telepeket, majd lemértük az átmérőjüket mm-ben. (A pontos mérést az tette lehetővé, hogy a *L. edodes*

micélium egyenletesen növekszik a szilárd táptalaj felületén a leoltás helyétől minden irányban, azaz a növekvő telep éles határvonallal rendelkezik, széle szabályos kör alakú. A különböző körülmények között azonos ideig növesztett telepek átmérőjének összehasonlításából következtetni lehet az adott körülmények növekedésre gyakorolt hatására.)

A kísérletek eredményének kiértékelése során kiszámítottuk a telep felületét, azaz a növekedés során elfoglalt területet, és ezt az értéket hasonlítottuk %-os arányban az adott kísérletben kontrollnak tekintett táptalajon mérhető növekedéshez: (a telep területe a vizsgált anyagot tartalmazó táptalajon [mm^2]-28 mm^2) / (a telep területe a kontroll táptalajon [mm^2]-28 mm^2)·100. (28 mm^2 a leoltáshoz használt 6 mm átmérőjű agarkorong által elfoglalt terület.)

Minden kísérletet 3 párhuzamosban végeztünk, a táblázatokban feltüntetett eredmények ezeknek a mintáknak az átlagát jelentik. A szignifikancia-vizsgálatokat a Mann-Whitney U-teszt alapján (Mann és Whitney 1947), SPSS 9.0 for Windows szoftver (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) segítségével végeztük, $P<0.05$ szignifikancia-szint mellett.

GraFit 3.01 szoftver (Erithacus Software Ltd.) segítségével a kontrollhoz viszonyított %-os értékeket ábrázoltuk a koncentráció függvényében, és a pontokra illesztett görbék alapján kiszámítottuk az 50%-os, illetve a nehézfémek esetén ezen kívül a 20%-os növekdésgátlást okozó koncentrációkat.

2.2.3. Anyagok

A malátaextraktum Scharlau Chemie, a kazein- és a laktalbumin-hidrolizátum Difco, a PEG Fluka, az összes többi vegyszer Reanal beszerzésű volt.

2.3. Eredmények

2.3.1. A szervetlen ionok hatása a micélium növekedésére

A vizsgált nátrium- és káliumsók, illetve az ammónium-klorid növekedésre gyakorolt hatását a 2/1. táblázat foglalja össze.

2/1. táblázat. Szervetlen ionok hatása a micélium növekedésére.

c	Nitrát		Klorid			Szulfát		Foszfát	
(mM)	$NaNO_3$	KNO_3	NaCl	KCl	NH_4Cl	Na_2SO_4	K_2SO_4	NaH_2PO_4	KH_2PO_4
5	50/100[a]	50/100	50/100	50/100	50/100	49/96	49/96	50/100	50/100
10	49/96	49/96	50/100	50/100	50/100	45/81	45/81	49/96	49/96
15	NM	NM	50/100	50/100	50/100	44/77	44/77	45/81	44/77
20	45/81	45/81	49/96	50/100	50/100	39/60	44/77	NM	41/67
25	44/77	44/77	46/84	50/100	45/81	37/54	43/74	40/64	41/67
30	NM	43/74	NM	NM	NM	35/48	41/67	NM	41/67
35	39/60	43/74	42/70	48/92	35/48	20/15	41/67	35/48	40/64
40	35/48	43/74	41/67	46/84	34/46	NN	41/67	20/15	40/64
50	NM	42/70	39/60	43/74	30/35		38/57	NN	36/51
60	23/20	42/70	NM	NM	NM		27/28		35/48
70	19/13	38/57	28/30	35/48	26/26		NM		33/43
80	19/13	37/54	NM	31/38	NM		NM		31/38
90	17/10	34/45	24/22	31/38	22/18		NM		NM
100	13/5	34/45	18/12	31/38	21/16		NM		NM
IC_{50}[b]	40	87	55	74	37	24	51	31	56

[a]Az első szám a három minta átlagaként számított telepátmérő (mm), a második szám a kontrollhoz viszonyított %-os növekedés (→2.2.2).

[b]50%-os növekedésgátlást okozó koncentráció (mM) (→2.2.2.)

NN: nincs növekedés; NM: az adott koncentrációnál a növekedést nem határoztuk meg.

Minden vizsgált anyag koncentrációfüggő gátlóhatással volt a micélium növekedésére, és egyik sem serkentette a növekedést a vizsgált koncentrációkban. Minden anion Na-sójának erősebb gátlóhatása volt, mint a megfelelő K-sónak ugyanolyan koncentrációban. A 2/1. táblázatban szereplő anyagok közül a Na_2SO_4 és a NaH_2PO_4 fejtette ki a legerősebb

gátlóhatást: 40 mM szulfát (80 mM Na mellett) illetve 50 mM foszfát (50 mM Na mellett) teljes növekedésgátlást idézett elő.

A PEG nem befolyásolta a micélium növekedését 1-15 g/l koncentráció-tartományban; a legmagasabb vizsgált PEG koncentráció, azaz 20 g/l mellett a telepátmérő 43 mm volt, ez 74%-os növekedést jelent a kontrollhoz képest. Ez az eredmény azt mutatja, hogy az ionok gátlóhatásának hátterében nem a magas koncentrációból adódó ozmotikus terhelés áll.

A nitrit erős növekedésgátló hatást fejtett ki egy nagyságrenddel kisebb koncentráció-tartományban, mint a többi ion (2/1. ábra). A $NaNO_2$ és a KNO_2 hatása között nem volt különbség. A 2/1. ábrán látható görbe alapján -11 napos növekedési periódust tekintve- 50%-os növekedésgátlást 0.8 mM nitrit okoz. 8 mM nitrit jelenlétében egyáltalán nem indult meg a növekedés, és 0.2 mM volt a legmagasabb nitritkoncentráció, mely még nem okozott mérhető gátlást.

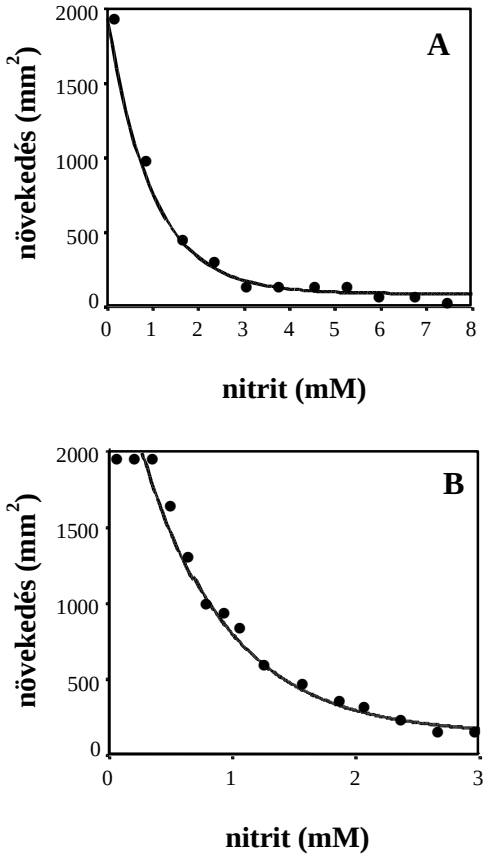
A nitrit gátlóhatását a növekedés szempontjából a glükózos Sabouraud agarnál kedvezőbbnek bizonyult táptalajösszetétel (3 g/l keményítő, 15 g/l malátaextraktum) (→2.3.2.) mellet is megvizsgáltuk. A nitritet nem tartalmazó kontroll mintához viszonyított %-os növekedési értékek még alacsonyabbak voltak, mint glükózos Sabouraud agar esetében (2/2. táblázat).

Abban az esetben, ha a nitritet a táptalajhoz annak hősterilizálása után adtuk hozzá, vagy nitrit törzsoldat megfelelő mennyiségének az agar felületén történő szélesztésével értünk el ugyanolyan végső nitrit-koncentrációt a táptalajban, ugyanolyan mértékű gátlóhatás volt mérhető, mint amikor autoklávozás előtt adtuk a nitritet a táptalajhoz.

2/2. táblázat. A nitrit ($NaNO_2$) gátlóhatása a glükózos Sabouraud agarhoz képest jobb növekedést biztosító táptalajon (3 g/l keményítő, 15 g/l malátaextraktum).

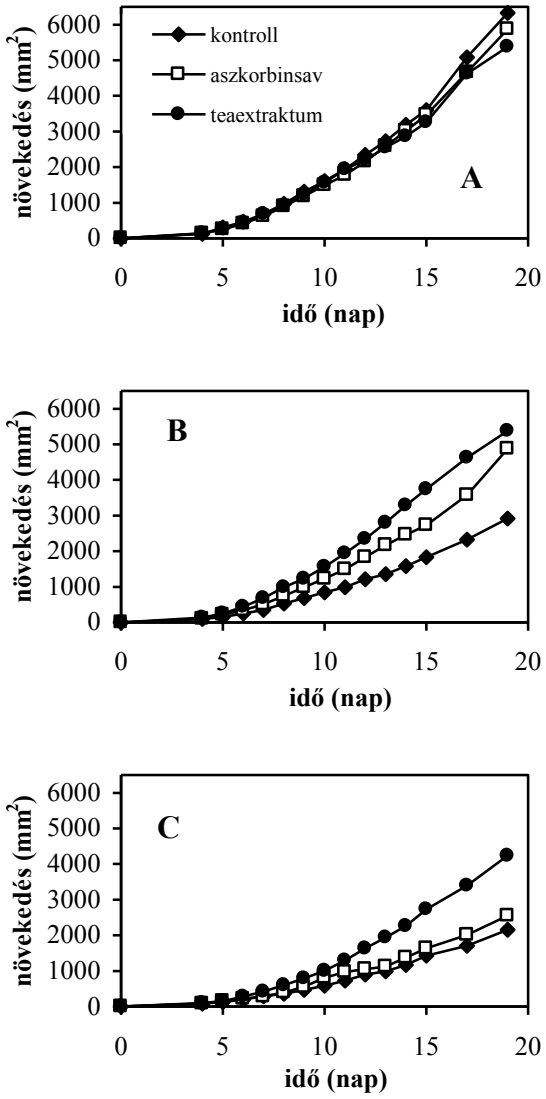
Nitrit c (mM)	Malátaextraktumos-keményítős táptalaj	Glükózos Sabouraud táptalaj
0	85/100[a]	50/100
0.58	45/28	41/67
0.73	36/18	36/51
1.5	26/9	25/24

[a]A számok jelentése megegyezik a 2/1. táblázat láb-jegyzetében leírtakkal.



2/1. ábra.

A nitrit ($NaNO_2$) koncentrációfüggő gátlóha-tása 0-8 mM (**A**) és 0-3 mM (**B**) koncentrá-ció-tartományban.



2/2. ábra.

A micélium növekedése aszkorbinsav (□) és teaextraktum (●) jelenlétében, nitrit nélkül (**A**), illetve 0.73 (**B**) és 1.5 (**C**) mM nitrit ($NaNO_2$) mellett.

A nitrit növekedésgátló hatása mérsékelhető volt aszkorbinsav vagy teaextraktum hozzáadásával (2/3. táblázat, 2/2. ábra). Ezek az anyagok a micélium növekedését az alkalmazott koncentrációban önmagukban nem befolyásolták szignifikánsan (2/2. ábra A). A teaextraktum 0.73 mM nitrit gátlóhatását teljesen kiküszöbölte: a növekedés a nitriten kívül teát is tartalmazó táptalajon (2/2. ábra B) és a nitritet nem, csak teát tartalmazó kontroll táptalajon (2/2. ábra A) nem tért el szignifikánsan. A gátlóhatás aszkorbinsav hozzáadásával szintén mérsékelhető volt: a 0.73 mM nitriten kívül aszkorbinsavat is tartalmazó táptalajon a telepméret az 5. naptól szignifikánsan nagyobb volt, mint a csak nitritet tartalmazó táptalajon (2/2. ábra B). 1.5 mM nitrit gátlóhatását is mérsékelni lehetett mind aszkorbinsav, mind teaextraktum hozzáadásával: előbbi esetében a 10., utóbbinál a 7. naptól szignifikánsan nagyobb volt a telepméret, mint a csak nitritet tartalmazó táptalajon (2/2. ábra C). (Az aszkorbinsav és a tea hatása nem összehasonlítható, mivel a teaextraktumban levő anyagok koncentrációja nem ismert.)

2/3. táblázat. Az aszkorbinsav és a teaextraktum növekedésgátlást csökkentő hatása.

	Nitrit c (mM)	Kontroll	Aszkorbinsav	Teaextraktum
11. nap	0.73	36/51[a]	44/77	50/100
	1.5	31/38	36/51	41/67
19. nap	0.73	61/46	79/77	83/85
	1.5	53/34	57/40	74/68

[a]A számok jelentése megegyezik a 2/1. táblázat lábjegyzetében leírtakkal.

2.3.2. A különböző táptalajkomponensek hatása a növekedésre

A szilárd táptalajon való növekedéssel kapcsolatos kísérleteink második felében különböző, a mikrobiológiai gyakorlatban gyakran használt táptalajkomponensek és egyéb kiegészítések növekedésre gyakorolt hatását vizsgáltuk azzal a céllal, hogy ideális táptalaj-összetételt hatá-rozzunk meg Shiitake micélium növesztéséhez.

2/4. táblázat. Növekedés különböző szénhidrátokat tartalmazó táptalajokon.

	Tápanyagok[a]:			
	szénhidrát (g/l)		élesztő-extraktum (g/l)	d/%[b]
1. csoport	glükóz	0	2	19/13
		10	2	47/88
		20	2	50/100
		30	2	50/100
		40	2	50/100
2. csoport	glükóz	10	2	47/88
		10	5	45/81
		10	10	35/48
		10	15	33/43
		10	20	27/28
3. csoport	szacharóz	10	2	28/31
		20	2	33/43
		30	2	34/46
		40	2	37/54
4. csoport	laktóz	40	2	36/51
	maltóz	40	2	49/96
	fruktóz	40	2	45/81
	keményítő	40	2	53/113
		20	2	54/117

[a]Minden táptalaj peptont (10 g/l) és a táblázatban felsorolt tápanyagokat tartalmazta.

[b]A számok jelentése megegyezik a 2/1. táblázat lábjegyzetében leírtakkal.

Az árnyékolással jelölt adat a leggyorsabb növekedésre utaló maximális átlagértéket emeli ki.

A *L. edodes* micélium jó növekedést mutat a gombák te-nyésztésénél gyakran alkalmazott Sabouraud glükóz agar táptalajon (Odds 1991), melyet a szervetlen ionok növekedésgátló hatásának tanulmányozása során alaptáptalaj-ként használtunk. Elsőként ennek a kiindulási táptalajnak az összeté-telét változtattuk meg, az eredmé-nyek a 2/4. táblázatban láthatók. A glükóz koncentrációjának csök-kentése 20-40 g/l tartományban nem okozott lassúbb növekedést (1. csoport). Az élesztőextraktum koncentrációjának növelése nem eredményezett gyorsabb növeke-dést, ellenkezőleg, a telepátmérő fordított arányban állt ennek a komponensnek a koncentrációjával (2. csoport). A glükóz helyettesíté-sére

kipróbált szénhidrátok közül csak a keményítő biztosított jobb növekedést (3. és 4. csoport).

2/5. táblázat. Növekedés különböző összetételű táptalajokon.

Nitrogénforrás	Szénhidrát (20 g/l)	Peptonnal (10 g/l)	Pepton nélkül
Élesztőextraktum (2 g/l)	glükóz	50/100[a]	40/63
	keményítő	50/100	53/113
Malátaextraktum (15 g/l)	glükóz	53/113	64/165
	keményítő	58/135	82/271
Élesztőextraktum (2 g/l) + Malátaextraktum (15 g/l)	glükóz	53/113	68/186
	keményítő	58/135	82/271

[a]A számok jelentése megegyezik a 2/1. táblázat lábjegyzetében leírtakkal.

Az árnyékolással jelölt adatok a leggyorsabb növekedésre utaló maximális átlagértékeket emelik ki.

2/6. táblázat. Növekedés keményítőt és malátaextraktumot különböző koncentrá-cióban tartalmazó táptalajokon.

Malátaextraktum c (g/l)	Keményítő c (g/l)	d/%[a]
15	0	70/73
15	1	79/93
15	3	85/108
15	5	83/103
15	15	82/100
15	20	82/100
0	5	44/28
5	5	78/90
10	5	77/88
15	5	83/103
20	5	82/100

[a]A számok jelentése megegyezik a 2/1. táblázat lábjegyzetében leírtakkal.

Az árnyékolással jelölt adat a leggyorsabb növekedésre utaló maximális átlagértéket emeli ki.

A következő kísérletben a glükózt és a keményítőt hasonlítottuk össze, illetve az élesztőextraktum malátaextraktummal való helyettesítését vizsgáltuk. A 2/5. táblázat fog-lalja össze az eredményeket. A keményítő ebben a kísérletben is jobbnak bizonyult a glükóznál. Ha a malátaextraktum jelen volt a táptalajban, akkor további pepton vagy élesztőextraktum hozzáadása feleslegesnek bizonyult, mivel a növekedés sebességét nem befolyásolta. Mivel a keményítő és a malátaextraktum mellett volt tapasztalható a leggyorsabb növekedés, a következő lépés ezen komponensek optimális koncentrációjának meghatározására irányult. A 2/6. táblázat eredményeiből látható, hogy az eddig vizsgáltak közül a 3 g/l keményítőt és 15 g/l malátaextraktumot tartalmazó táptalaj biztosította a legjobb növekedést.

2/7. táblázat. Növekedés keményítőt (3 g/l) és különböző nitrogénforrásokat tartalmazó táptalajokon.

Nitrogénforrás	c (g/l)	d/%[a]
Malátaextraktum	15	85/100
Laktalbumin hidrolizátum	5	60/50
	15	38/20
Kazein hidrolizátum	5	14/2
	15	NN
-	-	44/26

[a]A számok jelentése megegyezik a 2/1. táblá-zat lábjegyzetében leírtakkal.

2/8. táblázat. Növekedés természetes eredetű kiegészítéseket tartalmazó táptalajon[a].

Kiegészítés (20 g/l)	Keményítő (3 g/l)	Maláta-extraktum (15 g/l)	d/%[b]
-	+	+	85/100
tölgyfaforgács	-	-	80/89
	+	-	86/102
	-	+	89/110
	+	+	90/112
szalma	-	-	39/21
	+	-	63/55
	-	+	77/82
	+	+	80/89
búza	-	-	72/72

[a]A + és - jelek azt jelzik, hogy az adott tápanyag jelen volt -e a táptalajban.

[b]A számok jelentése megegyezik a 2/1. táblázat lábjegyzetében leírtakkal.

Az árnyékolással jelölt adat a leggyorsabb növekedésre utaló maximális átlagértéket emeli ki.

A koncentrá-ciók emelése ezen értékek fölé nem vezetett gyorsabb növekedéshez.

A peptonon és az élesztőextraktumon kívül más nitrogénforrásokat (laktalbumin és kazein hidrolizátum) is vizsgáltunk. A 2/7. táblázat adatai azt mutatják, hogy egyik tápanyag mellett sem volt jobb a növekedés, mint a malátaextraktum mellett. Korábbi eredmé-nyekkel (Boyle 1998) ellentétben a kazein hidrolizátum nem serkentette a növekedést, sőt, 15 g/l koncentráció mellett a növekedés meg sem indult.

Végül természetes eredetű komplex kiegészítések hatását vizsgáltuk. Az ered-ményeket a 2/8. táblázat tartalmazza. A tölgyfaforgács hozzáadása járt legkie-melkedőbb eredménnyel, az összes vizsgált táptalaj közül a 3 g/l keményítőn és 15 g/l malátaextraktumon kívül 20 g/l tölgyfa-forgácsot tartalmazó összetétel biztosította a leggyorsabb növekedést.

A fenti táptalajösszetételt optimális-nak tekintve ehhez hasonlítottuk a micé-lium növekedése szempontjából a sörgyár-tás során keletkező maláta mellékterméket. A malátát tartalmazó agarlemezeken való növesztési kísérlet eredményeit a 2/9. táb-lázat foglalja össze. A maláta mellett forgá-csot és keményítőt is tartalmazó agaron hasonló növekedés volt tapasztalható, mint az optimális táptalajon, malátaxtraktum mellett.

2/9. táblázat. Növekedés malátát tartalmazó táptalajokon[a].

Keményítő (3 g/l)	Malátaextraktum (15 g/l)	Tölgyfa-forgács	Maláta (100 g nedves súly/l)	d/%[b]
+	+	+	-	90/100
-	-	-	+	59/43
+	-	-	+	61/46
-	-	+	+	88/96
+	-	+	+	90/100

[a]A + és - jelek azt jelzik, hogy az adott komponens jelen volt -e a táptalajban.

[b]A számok jelentése megegyezik a 2/1. táblázat lábjegyzetében leírtakkal.

(A jó növekedést biztosító anyagokat az extracelluláris enzimtermelésre gyako-rolt hatásuk szempontjából is megvizsgál-tuk, a kísérletek eredményei a 3. fejezetben találhatók.)

2.3.3. Nehézfémek növekedésgátló hatása

Minden vizsgált nehézfémsó koncentrációfüggő növekedésgátló hatást okozott. Ez a hatás a szervetlen anionokkal kapcsolatos eredmények (→2.3.1.) alapján kizárólag a nehézfémeknek tulajdonítható, melyek a kísérletek eredménye alapján a következő sorrendbe állíthatók csökkenő toxicitás szerint: Cd (0.0087) > Hg (0.015) > Ni (0.35) > Co (0.46) > Zn (0.62) > Cu (1.3) > Fe (1.6) > Pb (2.7) > Mn (3.1); a zárójelben szereplő számok az 50%-os növekedésgátlást okozó koncentrációk (mM).

0.05 mM Cd és Hg teljes gátlást eredményezett, a többi nehézfém nem befolyásolta a növekedést ebben a koncentrációban. 1.5 mM koncentráció felett a Fe, a Pb és a Mn kivételével egyik nehézfém jelenlétében sem indult meg a növekedés.

2.4. Az eredmények értékelése

2.4.1. A szervetlen ionok hatása a növekedésre

A szervetlen ionok gátlóhatásával kapcsolatos kísérletsorozatunkat egy magyarországi gombatermesztő problémájának megoldása kapcsán indítottuk el, aki azt tapasztalta, hogy a szalmával töltött zsákokon a leoltás után a micélium növekedése nem indult meg. Mint utólag kiderült, ennek oka az volt, hogy a víz, amelyet a szalma nedvesítésére használt, nagy

koncentrációban tartalmazott nitrát-, foszfát- és ammóniumionokat, melyek a műtrágya-maradvánnyal szennyezett talajból kerültek az öntözővízbe. Kísérleteink eredményei szerint minden szervetlen ion esetében más az a maximális koncentráció, mely mellett az adott ion még nem okoz növekedésgátlást. Ezek általában viszonylag magas értékeknek bizonyultak, melyek csak speciális esetben fordulhatnak elő és okozhatnak problémát, ilyen a fent említett eset is. Kivételt képez a nitrit, mely 0.2 mM koncentráció felett okozott növekedésgátlást, abban az esetben is, ha a hősterilizálás után adtuk a táptalajhoz. (Ez arra utal, hogy a gátlásért nem a nitrit és valamelyik táptalajkomponens magas hőmérséklet hatására lejátszódó reakciójának terméke felelős.) A nitrát önmagában a többi ionhoz viszonyítva is csak igen magas koncentrációban okozott gátlóhatást, de figyelembe kell venni, hogy számos baktérium képes a nitrátot redukálni nitrit keletkezése mellett (Richardson és Watmough 1999). Ezáltal, ha ilyen baktériumtörzsek vannak jelen a termesztés során a gombamicélium környezetében, alacsony nitrátkoncentrációk is problémát jelenthetnek a nitrit felszabadulása miatt.

Fenolvörös indikátort tartalmazó táptalajon a leoltás helye körül sárga zóna jelenik meg már a látható micéliumnövekedést megelőzően, mely fennmarad a növekedés megindulása után is a telep szélei körül, jelezve, hogy a növekvő micélium maga körül savas közeget teremt. A nitrit erős mutagén hatással rendelkezik, ezt nem közvetlenül maga az ion, hanem a nitrit és különböző prekurzor molekulák elsősorban savas körülmények között lejátszódó reakciója során keletkező nitrozovegyületek okozzák (Luca és mtsai 1987; Whong és mtsai 1987; Routledge és mtsai 1994). A nitrozovegyületek keletkezése és a mutagén hatás gátolható aszkorbinsav (Whong és mtsai 1987; Licht és mtsai 1988; Tannenbaum és mtsai 1991) vagy teaextraktum (Stich és mtsai 1982; Stich és mtsai 1992; Tanaka és mtsai 1998) hozzáadásával. A táptalaj tartalmazhat olyan komponenseket, melyek a micélium növekedése során fellépő savas körülmények között a nitrittel reakcióba lépve nitrozovegyületekké alakulnak át, ez lehet a nitrit jelenlétében tapasztalt növekedésgátlás egyik oka. Alátámasztja ezt a feltételezést az az eredmény, miszerint -hasonlóan más bakteriális illetve *in vitro* és *in vivo* eukarióta tesztrendszerekben tapasztaltakhoz- a növekedésgátlás mérsékelhető volt aszkorbinsav vagy teaextraktum hozzáadásával.

2.4.2. A különböző táptalajkomponensek hatása a növekedésre

A táptalaj összetételének növekedésre gyakorolt hatásával foglalkozó kísérletekben a 3 g/l keményítőt, 15 g/l malátaextraktumot és 20 g/l tölgyfaforgácsot tartalmazó táptalaj bizonyult

optimálisnak. A szalma hozzáadása nem serkentette a növekedést, mint ahogy az a forgács esetében tapasztalható volt. Ez az eredmény párhuzamba állítható azzal, hogy a *L. edodes* micélium jó lignin- és keményítő-lebontási képességgel rendelkezik, viszont gyenge cellulóz-lebontó (El-Zalaki és Hamza 1979; Leatham 1985). A táptalaj-optimalizálási kísérletek jelentősége többek között abban áll, hogy az eredmények bizonyítják a különböző mezőgazdasági és élelmiszeripari melléktermékek felhasználhatóságát gombamicélium előállítására. Számos ilyen melléktermékről bizonyított, hogy felhasználható táptalajként Shiitake micélium növekedéséhez és termőtestképzéséhez (Salmones és mtsai 1999; Fujihara és mtsai 2000; Leifa és mtsai 2000); az általunk kipróbált ilyen jellegű anyag, a sörgyártás során keletkező maláta is alkalmasnak bizonyult erre a célra. Ezeknek a melléktermékeknek a felhasználása jelentősen csökkentheti a termelés költségeit.

Az elvégzett kísérletek eredményeinek a micélium nagy mennyiségben történő előállítása céljából kidolgozott technológiák hatékonyságának növelése szempontjából lehet jelentősége. Az ehető gombák, köztük a Shiitake fogyasztása és termesztése Magyarországon és az egész világon egyre szélesebb körben terjed, nemcsak nagyüzemi, de egyetlen háztartás számára termelő méretekben is. Minden eljárás alapja a micélium felszaporítása különböző természetes vagy mesterséges eredetű tápanyagok és hordozóanyag keverékének felületén. A keverék összeállítása és további kezelése során a különböző szerves és szervetlen tápanyagok serkentő és gátlóhatásának ismerete alapvető jelentőséggel bír a gyors növekedés elérése és ezáltal a hatékonyság növelése érdekében.

2.4.3. Nehézfémek növekedésgátló hatása

A vizsgált nehézfémek közül a Cd-nak volt a legerősebb gátlóhatása. A WRF csoportba tartozó fajok általában érzékenyek erre a nehézfémre: 0.05 mM Cd, mely a *L. edodes* esetében teljes gátlást okozott, szintén erősen gátolta a növekedést *Pleurotus sajor-caju* (Purkayastha és mtsai 1994) és *Inonotus obliquus* (Baldrian és Gabriel 1997) fajok esetében. 0.1 mM Cd szintén megakadályozta a növekedést folyadékkultúrában *Pycnoporus sanguineus* és *Trametes versicolor* fajoknál (Pointing és mtsai 2000).

A *Phanerochaete chrysosporiummal* ellentétben, mely képes nagy koncentrációjú Hg jelenlétében növekedni (Dhawale és mtsai, 1996), a *L. edodes* igen érzékenynek bizonyult erre a fémre. 0.05 mM Hg, mely a *P. chrysosporium* növekedését nem befolyásolta folyadékkultúrában, az általunk használt kísérleti rendszerben teljes növekedésgátlást okozott. A *P. sajor-caju*, *Daedalea quercina*, *Ganoderma applanatum*, *Pleurotus ostreatus*,

Pycnoporus cinnabarinus, *Stereum hirsutum* és *Serpula lacrimans* fajok hasonlóan érzékenynek bizonyultak a Hg-ra (Purkayastha és mtsai 1994; Mandal és mtsai 1998). Általában véve a Cd és a Hg rendelkezik a legerősebb toxikus hatással a WRF csoport tagjaira (Sanglimsuwan és mtsai 1993; Baldrian és Gabriel 1997).

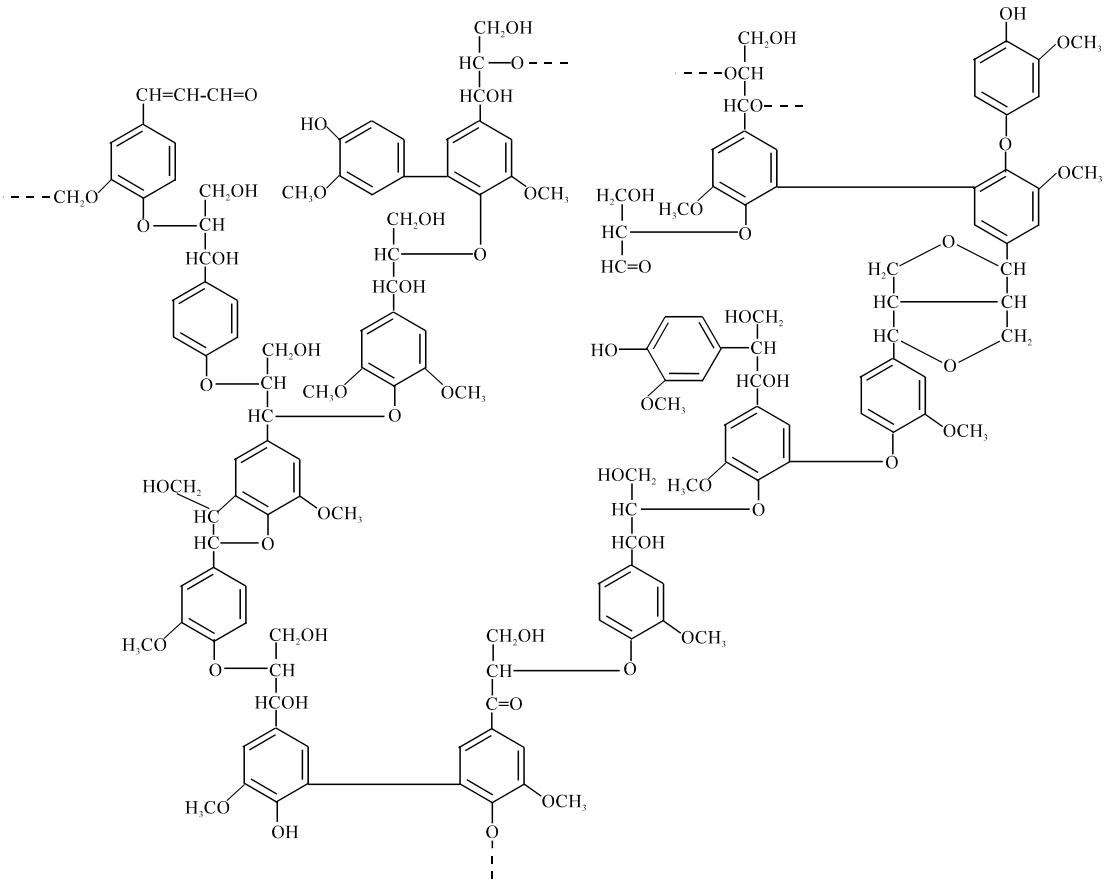
Ellentétben a Cd és a Hg esetével, a *L. edodes* kevésbé érzékenynek bizonyult Zn, Cu és Pb jelenlétére: ezeknek a nehézfémeknek a 0.2 mM-os koncentrációja a növekedést nem befolyásolta szignifikánsan. Ilyen mennyiségű Zn vagy Cu a *P. chrysosporium*, *P. sanguineus*, *T. versicolor* és *P. sajor-caju* fajok esetében (Purkayastha és mtsai 1994; Pointing és mtsai 2000), illetve a Pb a *P. sajor-caju* esetén már egy nagyságrenddel kisebb koncentrációban is igen erős növekedésgátlást okozott (Purkayastha és mtsai 1994).

Bizonyos gombafajok képesek nehézfémek viszonylag magas koncentrációjának jelenlétében növekedni, és azokat nagy mennyiségben akkumulálni (Dhawale és mtsai 1996; Gabriel és mtsai 1996; Melgar és mtsai 1998; Cihangir és Saglam 1999). Ez a jelenség emberi fogyasztásra kerülő ehető gombák esetében komoly veszélyt jelenthet a nehézfémek egészségkárosító hatása miatt. A *L. edodes* micélium ellenállónak bizonyult bizonyos nehézfémek viszonylag magas koncentrációjával szemben. Az ilyen rezisztencia különösen akkor jelenthet problémát, ha a gombatermesztés esetlegesen nehézfémekkel szennyezett ipari vagy mezőgazdasági melléktermékeken történik (Bressa és mtsai, 1988; Favero és mtsai, 1990). Ugyanakkor a nehézfémek jelenlétét jól toleráló gombafajok hatékonyan alkalmazhatóak olyan bioszorpciós technológiák során, melyeknek célja a toxikus fémek eltávolítása (Siegel és mtsai 1990; Yetis és mtsai 2000), vagy értékes fémek kivonása (Nakajima és Sakaguchi 1993) ipari szennyvizekből; illetve olyan bioremediációs technológiákban, ahol a szennyezett területen a biológiailag lebontható veszélyes anyagok mellett nehézfémek is jelen vannak.

3. Az extracelluláris enzimrendszer vizsgálata

3.1. Bevezetés

A faanyag, mely számos gombafaj természetes tápközege, csak igen kis mennyiségben tartalmaz könnyen hasznosítható szénhidrátokat és nitrogént. Fő komponensei a cellulóz (40-50%), a hemicellulóz (25-40%) és a lignin (20-35%). A lignin változatos összetételű, bonyolult, háromdimenziós szerkezetű (3/1. ábra), nehezen lebontható polimer (Wainwright 1992).



3/1. ábra

A lignin szerkezete.

A cellulóz lebontására számos organizmus képes (Beguin és Aubert 1994; Tomme és mtsai 1995), míg a lignin bonyolult szerkezetű polimer molekulájának degradációjára képes fajok sokkal ritkábbak. A lignin lebontása obligát aerob oxidatív folyamat, mely a szekunder metabolizmus során megy végbe. Maga a lignin nem szolgál energiaforrásként, viszont a degradáció során a faanyag ligninhez kötött poliszacharid molekulái hozzáférhetővé válnak a lebontó organizmus számára, olyan energiaforrásként szolgálva, mely más organizmusok számára nem elérhető (Jeffries 1990). A leghatékonyabb lignindegradációra a faanyag fehér színű korhadását okozó gombák csoportja (WRF) képes. A *Lentinus* fajokon kívül számos olyan ismert gomba tartozik ebbe a csoportba, mint például a laskagombák (*Pleurotus* fajok), vagy a különböző taplógombák (*Daedalea, Trametes, Ganoderma* fajok). A csoport nevét onnan kapta, hogy az enzimatikus lebontási folyamatok következtében a faanyag kifehéredik.

A WRF csoprtba tartozó fajoknak közös jellemzője, hogy speciális extracelluláris enzimrendszerrel rendelkeznek, mely képessé teszi őket a lignin lebontására. Az enzimrendszert három enzim alkotja, két hem-tartalmú peroxidáz enzim, a lignin peroxidáz (LiP, EC 1.11.1.14) (Tien és Kirk 1983) és a mangán-dependens peroxidáz (MnP, EC 1.11.1.13) (Glenn és Gold 1985), valamint egy réztartalmú fenoloxidáz enzim, a lakkáz (Lcc, EC 1.10.3.2) (Thurston 1994). Az enzimek termelése konstitutív (Eggert és mtsai 1996; Pointing 2001). A Lcc enzimet általában minden faj termeli, a LiP és a MnP közül viszont gyakran csak az egyiket. A *L. edodes* enzimrendszerét a Lcc és a MnP alkotja; a LiP vagy egyáltalán nincs jelen, vagy csak igen kis mennyiségben termelődik, és szerepe elhanyagolható a másik két enziméhez képest (Leatham 1985; Buswell és mtsai 1995). A Lcc és a MnP általános jellemzőit a 3/1. táblázat foglalja össze.

A Lcc enzim $O_2 \rightarrow H_2O$ redukció mellett oxidálja az elektrondonorként szolgáló szubsztrátját. Szubsztrátspecifitása igen alacsony, de főleg mono-, di- és polifenolos komponenseket oxidál (Buswell és Odier 1987; Eggert és mtsai 1996). A MnP enzim szubsztrátja a Mn^{2+} ion, működése során hidrogén-peroxid jelenlétében $Mn^{2+} \rightarrow Mn^{3+}$ oxidáció történik (Glenn és mtsai 1986). A folyamathoz szükséges hidrogén-peroxidot egyéb enzimek termelik intracellulárisan, pl. a szuperoxid dizmutáz (EC 1.15.1.1), a glükóz oxidáz (EC 1.1.3.4) vagy a metanol oxidáz (EC 1.1.3.31) (Kelley és Reddy 1986; Leonowicz és mtsai 1999). A keletkező Mn^{3+} iont kis molekulatömegű szerves savak (oxalát, malonát, malát stb.) stabilizálják (Wariishi és mtsai 1992).

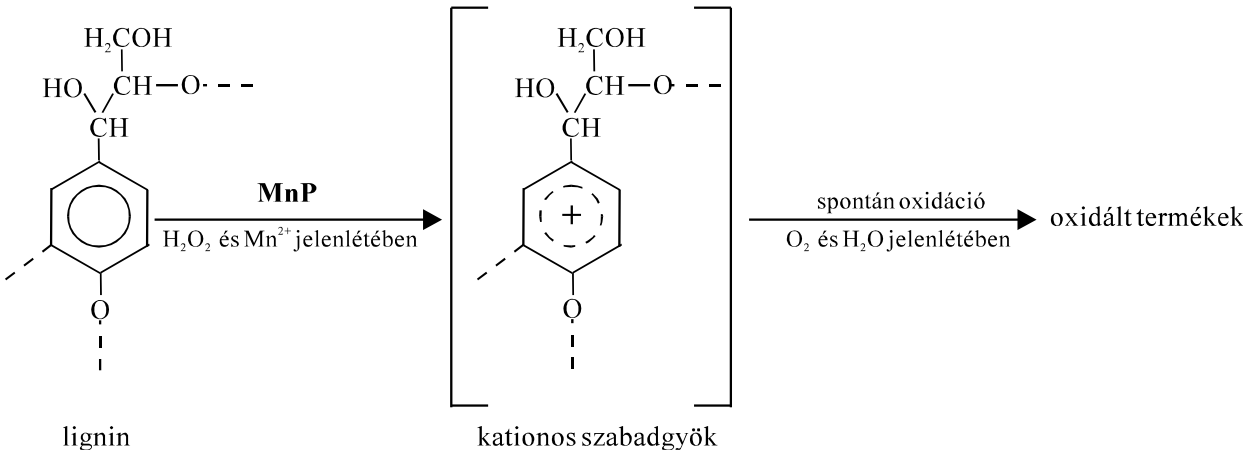
3/1. táblázat. A Lcc és a MnP enzimek általános jellemzői (Fakoussa és Hofrichter 1999).

Tulajdonság	Lcc	MnP
• Előfordulás	A WRF csoport tagjain kívül egyéb gombafajok (*Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*) és növények (*Nicotiana tabacum*, *Acer pseudo-platanus*) is termelik.*	Kizárólag WRF fajok termelik.
• Szerkezet	mono,- di- vagy tetramer; glikoprotein	monomer; glikoprotein
• Katalitikus centrum	4 rézatom	Fe-protoporfirin (hem)
• H_2O_2 igény	-	+
• Molekulatömeg (kDa)	53-110	38-47
• pH-optimum	3.5-7	4-4.5

*(Thurston 1994; O'Malley és mtsai 1993)

A Lcc által oxidált molekulák illetve a komplex formában stabilizált Mn^{3+} ion diffuzibilis redox mediátorként működnek, képesek számos aromás és alifás vegyület oxidációjára, miközben maguk az emzimatikus lépés előtti redukciós állapotba alakulnak vissza. Mindkét enzim működése következtében tehát indirekt aspecifikus oxidáció történik, melynek során szabadgyökök képződnek, ezek további reakciókat indítanak el, melyek kovalens kötések felbomlásához, aromás gyűrűk felnyitásához vezetnek (Kirk és Shimada 1985; Tuor és mtsai 1992). A lignin lebontása során a szabadgyök-képződés a polimer aromás komponensein indul meg (3/2. ábra).

A fenti folyamat jellegéből adódik az enzimrendszer degradációs működésének legfontosabb jellemzője, az aspecificitás. Ennek köszönhetően a WRF csoportba tartozó gombák, illetve tisztított extracelluláris enzimeik számos környezetszennyező anyag lebontására képesek, melyeknek szerkezete a ligninéhez hasonló (Bumpus és mtsai 1985; Shah et al 1992; Barr és Aust 1994; Pointing 2001). Ez különösen nagy jelentőséggel bír az olyan anyagok esetében, mint a négynél több benzolgyűrűt tartalmazó poliaromás szénhidrogének (PAH), mivel ezeknek az igen toxikus molekuláknak a lebontása nagy méretük, alacsony vízoldhatóságuk és a talajrészecskékhez való erős adszorpciójuk miatt bakteriális úton nem indulhat meg (Field és mtsai 1992). Az extracelluláris enzimek működése során keletkező szabadgyökök által oxidált PAH molekulák biodegradabilitása megnő, lebonthatóvá válnak a talaj mikroorganizmusai számára (Meulenberg és mtsai 1997). Az aspecifikus oxidációért felelős mediátorok kis méretüknek köszönhetően a diffúzió segítségével az enzimek termelődésének helyétől távol is kifejthetik hatásukat, speciális



3/2. ábra

Szabadgyök képződése a lignin aromás komponensein.

esetben olyan helyeken is, ahová maguk az enzimek méretük miatt el sem juthatnának (Fakoussa és Hofrichter 1999).

A bioremediációs eljárások mellett a WRF csoportba tartozó gombák enzimrendszerének másik ipari alkalmazási területe a kiindulási anyagok természetes eredetű lignintartalmának lebontásán alapul (Pointing 2001). Ennek egyrészt a mezőgazdasági és élelmiszeripari hulladékanyagok kezelésénél van jelentősége, amikor a lignintartalom csökkentése által jobb minőségű, könnyebben emészthető állati takarmány nyerhető (Agosin és mtsai 1985), másrészt a papírgyártás lépései során. A papírgyártás első lépéseként el kell különíteni a papír alapanyagát adó természetes növényi rostokat, melyeket a cellulóz épít fel: a feltárás során a faanyagból megfelelő nyomáson és hőmérsékleten vegyszerekkel (Na-hidroxid, Na-szulfát) kioldják a lignint és a hemicellulózt. A folyamat végterméke a papírpép, mely a lignin bomlástermékei miatt jellegzetes barna színű. A következő lépésben ezt az elszíneződést szüntetik meg többlépcsős technológiákban, szintén vegyi úton, klórral, klór-dioxiddal, hipoklorittal és oxigénnel. Mind a feltárás, mind a fehérítés során számos környezetszennyező anyag keletkezik, melyek közül különösen veszélyesek a klórozott aromás szénhidrogének, pl. a doixinok. Ligninbontó képességüknek köszönhetően a WRF csoport tagjai alkalmazhatóak lehetnek mindkét lépés során az eljárás hatékonyságának növelésére és a felhasználandó vegyszerek mennyiségének csökkentésére (Wainwrigth 1992; Pointing 2001), ezenkívül a keletkező szennyvíz kezelésére (Archibald és mtsai 1990; Michel és mtsai 1991). A *L. edodes* jó ligninlebontási képességgel rendelkezik, viszont gyenge

cellulóz-lebontó (El-Zalaki és Hamza 1979; Leatham 1985); az ilyen WRF-törzsek különösen alkalmasak a fent említett célokra, hiszen a feltárás során a cellulóz nem bomolhat el.

Kísérleteink során a *L. edodes* micélium extracelluláris enzimtermelését vizsgáltuk különböző körülmények között: (1) a sörgyártás során keletkező maláta melléktermékén, (2) *Trichoderma* metabolitok jelenlétében, (3) különböző összetételű táptalajokon, illetve (4) nehézfémek jelenlétében, az utóbbi két esetben különböző festékanyagok lebontásával párhuzamosan.

3.2. Célkitûzések

3.2.1. Enzimtermelés a sörgyártás során keletkezõ maláta melléktermékén

Az élelmiszeripari és mezőgazdasági hulladékok, melléktermékek széles körben felhasználhatók különböző fermentációs eljárások alapanyagaként. Ezeknek az eljárásoknak a legfontosabb előnye, hogy a melléktermékekből, melyek gyakran veszélyes hulladéknak minősülnek, értékes produktumok állíthatók elő az azokat növekedésük során anyag- és energiaforrásként felhasználó organizmusok anyagcseréjének termékeként, miközben maga a hulladék elbomlik. A különböző gombatörzsek jól növekednek szilárd tápközeg felületén, ezért különösen jól felhasználhatók ilyen szilárd fázisú fermentációs eljárások során (Moo-Young és mtsai 1983; Considine és mtsai 1989). A folyamat célja lehet magának a biomasszának (Sanjust és mtsai 1991; Salmones és mtsai 1999; Leifa és mtsai 2000; Fujihara és mtsai 2000; Pandey és mtsai 2000) vagy az általa előállított különféle anyagcseretermékeknek a produkciója, mint a különböző szerves savak (Pandey és mtsai 2000), aromaanyagok (Pandey és mtsai 2000; Soares és mtsai 2000) vagy enzimek (Mahmoud és mtsai 1978; Berovic és Ostroversnik 1997; Gawande és Kamat 1999; Zheng és Shetty 2000a; Zheng és Shetty 2000b). Mivel ezek a melléktermékek nagy mennyiségben tartalmaznak természetes eredetű polimer molekulákat (cellulóz, lignin, keményítő, pektin), táptalajként való felhasználásuk útján nagy mennyiségű, a polimerek lebontására termelődő enzim állítható elő. A leggyakrabban használt mikroorganizmusok az *Aspergillus* genusba tartoznak, egyes törzsek segítségével előállítható pl. amiláz (Mahmoud és mtsai 1978) és xilanáz (Gawande és Kamat 1999) búzakorpán és melaszon, vagy pektinészteráz és poligalakturonáz különböző gyümölcsök feldolgozása során keletkező melléktermékeken (Berovic és Ostroversnik 1997). Az utóbbi csoportba tartozó szubsztrátokon a *L. edodes* is

képes növekedni és enzimeket (poligalakturonáz, β-glükozidáz) termelni (Zheng és Shetty 2000a; Zheng és Shetty 2000b), miközben az *Aspergillus* fajokkal ellentétben toxinokat nem termel.

A sörgyártás malátakészítési lépése során az árpát vízbe áztatják, hogy a magvak csírázása és ezáltal a maltóz felszabadulása meginduljon. A maltózt tartalmazó vizes extraktumot a folyamat végén kipréselik a magvakból, ez a folyadék a sörgyártás további lépéseinek alapja. A keletkező maláta melléktermék, melyet kísérleteink során felhasználtunk, tápanyagokban (keményítő, maltóz, aminosavak, vitaminok) igen gazdag. Amint az a 2. fejezet eredményei között már szerepelt, a micélium növekedése szempontjából a maláta igen jó táptalajnak bizonyult (→2.3.2., 2/9. táblázat); további kísérleteinkben azt vizsgáltuk, alkalmas -e az enzimtermelés szempontjából is. Az eredmények és értékelésük a 3.4.1. pont alatt található.

3.2.2. Trichoderma *metabolitok hatása az enzimtermelésre*

A Shiitake gomba termesztése során a micéliumot különféle növényi eredetű anyagok (szalma, faforgács stb.) keverékével töltött műanyag zsákokban növesztik. Ezeknek az alapanyagoknak a nagy mennyiségben történő sterilizálása igen nehéz feladat; a legkomolyabb problémát a szaporítóanyag fertőződése jelenti egyéb gombatörzsek által (Royse és mtsai 1985). Ezek a fajok sokkal gyorsabban növekednek, mint a *L. edodes* micélium, így könnyen képesek azt visszaszorítani, és ezáltal nagy károkat okozni. A legnagyobb veszteségeket okozó fajok a *Trichoderma* genusba tartoznak (Tokimoto és Komatsu 1979; Badham 1991). Számos *Trichoderma* faj mikoparazita tulajdonságokkal rendelkezik, többek között ehető gombákkal szemben is (Chen és mtsai 1999; Ospina-Giraldo és mtsai 1999). Ennek a tulajdonságnak köszönhetően a *Trichoderma* törzsek alkalmazhatóak fitopatogén gombák (*Fusarium, Pythium, Rhizoctonia*) elleni biológiai védekezésben (Papavizas 1985; Benítez és mtsai 1998).

A micélium által elfoglalt területért és a tápanyagokért folytatott kompetíció során a *L. edodes* és a *Trichoderma* olyan növekedésgátló hatású metabolitokat termel, melyek visszaszoríthatják az antagonista növekedését (Savoie és mtsai 2000). Mindkét faj extracelluláris enzimrendszere fontos szerepet játszik az ilyen jellegű védekezési folyamatokban; antagonizmus esetén mindkét fél enzimtermelése megváltozik. Folyadékkultúrában nevelt *L. edodes* micélium Lcc-termelése mind *Trichoderma* micélium, mind pedig sejtmentes fermentlé hozzáadására megnőtt (Savoie és mtsai 1998). Ez a jelenség

szalmán növesztett *L. edodes* micélium esetében is megfigyelhető volt; ezzel szemben a MnP-termelés nagymértékben lecsökkent *Trichoderma* antagonizmus hatására (Savoie és Mata 1999).

Kísérleteink célja az volt, hogy megvizsgáljuk a *L. edodes* extracelluláris enzimtermelésének megváltozását szilárd táptalajon, különböző *Trichoderma* fajokkal való antagonizmus, illetve folyadékkultúrában növesztett *Trichoderma* fermentlevének hatására. Az eredmények és értékelésük a 3.4.2. pont alatt található.

3.2.3. Az enzimatikus folyamatok tápanyagfüggése

A micélium növekedéséhez hasonlóan a táptalaj összetétele nagymérékben befolyásolja az extracelluláris enzimek ternelődését. Az enzimek biotechnológiai és bioremediációs alkalmazásához szükség van nagy mennyiségben történő előállításukra; a táptalaj összetételének optimalizálása ennek hatékonyságát növeli. Nemcsak a termelt enzimek mennyisége, hanem degradációs működésük is függ a tápanyagok minőségétől és mennyiségétől.

Kísérleteink során a *L. edodes* extracelluláris enzimrendszerének működését vizsgáltuk különböző táptalajokon. A degradációs kapacitásra adott körülmények között a táptalajhoz adott festékanyagok elszíntelenítése útján következtettünk. Bizonyos festékek, mint pl. a Poly R-478 vagy a Remazol Brilliant Blue R (RBBR) szerkezete (3/3. ábra) hasonló az aromás gyűrűt tartalmazó környezetszennyező anyagokéhoz (pl. PAH), viszont jól oldódnak vízben, kevésbé mérgezőek és spektrofotometriásan mérhetők, ezért jól felhasználhatók modellvegyületként a biodegradációs folyamatok nyomon követésére, illetve jó lebontási képességekkel rendelkező törzsek szelektálására (Gold és mtsai 1988; Field és mtsai 1992; Swamy és Ramsay 1999a; Bhatt és mtsai 2000) (3/1. kép). (A festékek színének az extracelluláris enzimek működésének hatására bekövetkező megváltozása minimum egy kémiai kötés felhasadásának következménye, de nem jelenti a teljes mineralizációt. Ebben a fejezetben a festékek lebontását ilyen értelemben, tehát az elszíntelenítéssel egyenértékű kifejezésként használtuk.) Ezenkívül maguk a festékanyagok is környezetszennyező veszélyforrásnak számítanak, lebontásukra pl. textilüzemek szennyvizének tisztítása során van szükség; az ehhez kapcsolódó technológiák során a laboratóriumi modellek kidolgozása nagy jelentőségű lehet (Knapp és mtsai 1995; Swamy és Ramsay 1999a). Kísérleteink eredménye és értékelésük a 3.4.3. pont alatt található.

3.2.4. Nehézfémek hatása az enzimtermelésre

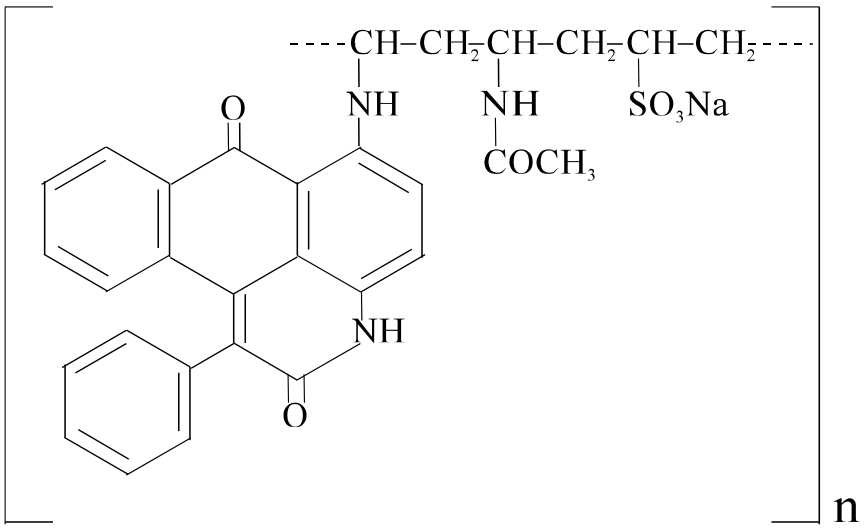
A nehézfémek a WRF csoportba tartozó fajoknál nemcsak a növekedést befolyásolják, hanem az extracelluláris enzimek termelését (Baldrian és mtsai 2000) és a biodegradációs kapacitást is (Pointing és mtsai 2000). Kísérleteink célja az volt, hogy megvizsgáljuk ezeket a hatásokat *L. edodes* esetében. Az eredményeket a 3.4.4. pont foglalja össze.

3.3. Anyagok és módszerek

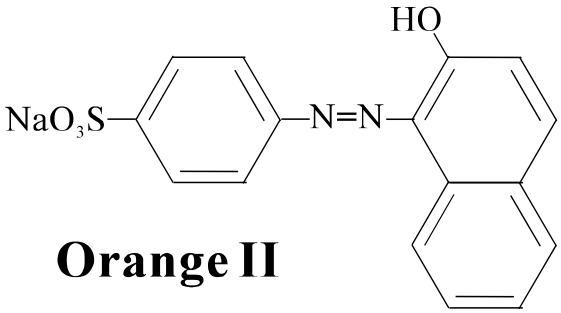
3.3.1. Enzimtermelés a sörgyártás során keletkezõ maláta melléktermékén

A kísérletek során sörgyári maláta melléktermék (80% nedvességtartalom), tölgyfaforgács (kb. 0.5 cm-es darabok) és perlit 2:1:1 arányú keverékén felnövesztett micélium enzimtermelését vizsgáltuk. (A malátakeverék összetételét az előkísérletek eredményei alapján állítottuk össze, melyek során azt tapasztaltuk, hogy a forgács hozzáadása serkenti a MnP-termelést, a perlit pedig megfelelően laza szerkezetet biztosít ahhoz, hogy a micélium teljesen átszőhesse a keveréket.) A keveréket autoklávozással sterilizáltuk (115 °C, 50 perc).

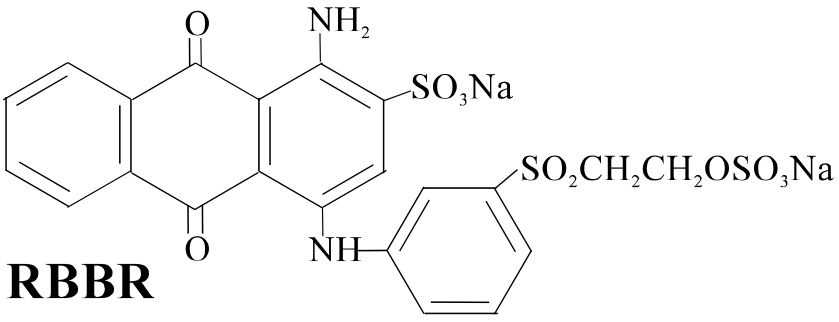
Az enzimtermelést három különböző rendszerben vizsgáltuk, mindhárom esetben a fent említett malátakeveréket használtuk szubsztrátként. Kémcsövekben 10 g/l malátaextraktumot (Scharlau) tartalmazó tápfolyadékban (4-4 ml) agarkorongon leoltott micéliumot növesztettünk 3 hétig, majd ezeket a micéliumgömböket használtuk inokulumként a keverék leoltásához.



Poly R-478

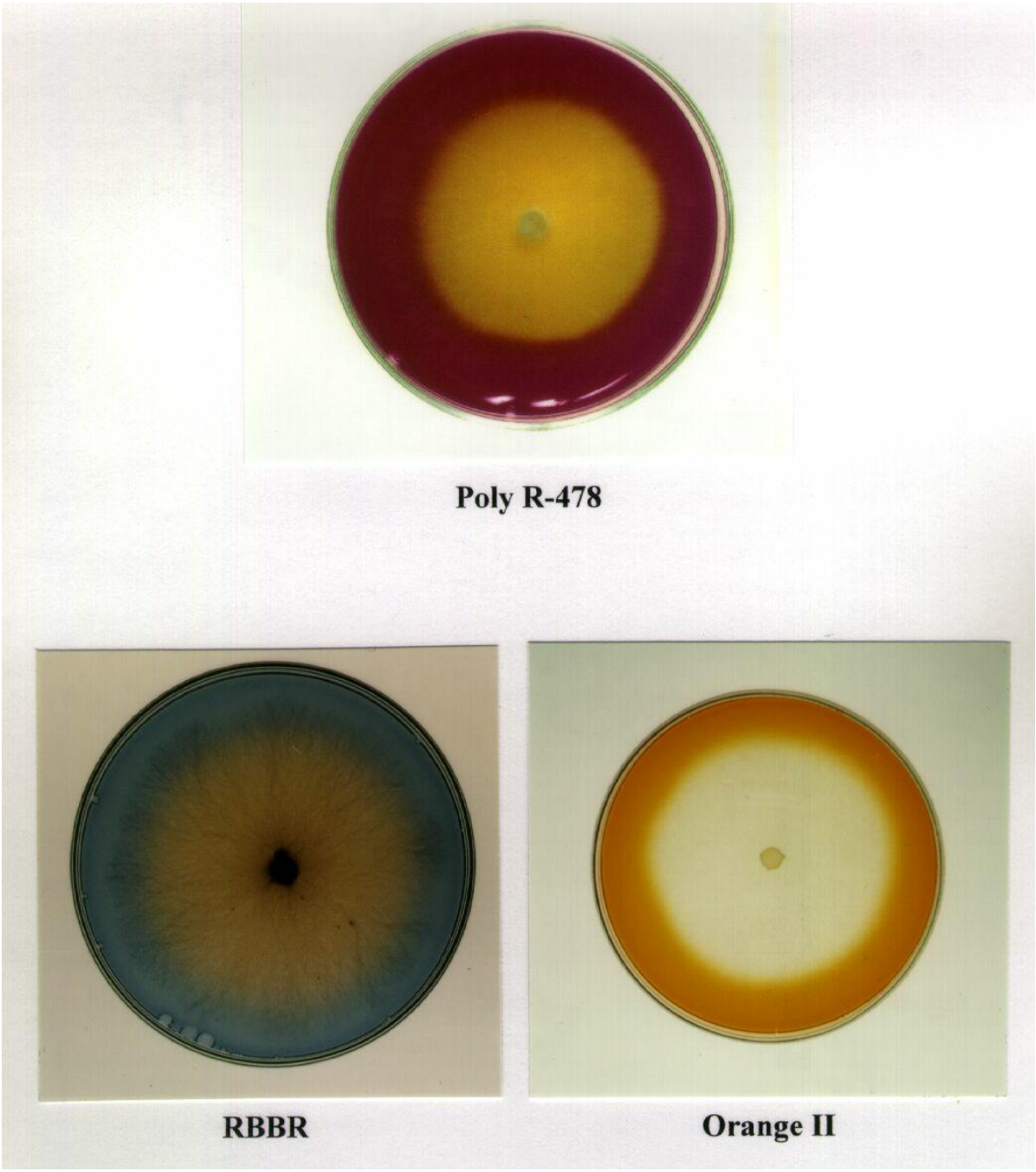


Orange II



RBBR

3/3. ábra.
A kísérleteink során vizsgált festékanyagok kémiai szerkezete.



3/1. kép

Lebontási zónák különböző festékeket tartalmazó táptalajokon.

Az **1-es számú rendszer** a szilárd fázisú fermentáció modellje volt. 90 mm átmérőjű Petri csészékben oltottuk le a keveréket 8 párhuzamosban, a tenyészeteket szoba-hőmérsékleten inkubáltuk. A 12. napra a micélium teljesen benőtte a keveréket, ezután hetente mintát (kb. 0.2 g) vettünk a csészék széléről. A mintákat négyszeres mennyiségű ioncserélt vízben extraháltuk az agarmintákhoz hasonló módon (→3.3.3.), majd mértük mindkét enzim aktivitását az extraktumban (→3.3.5.).

A **2-es számú rendszer** egy átfolyós rendszerű oszlopreaktor volt. Két kísérletet végeztünk, mindkettőt két párhuzamosban: 50 ml-es műanyag fecskendőket töltöttünk meg a malátakeverékkel, és növesztettünk benne micéliumot 2 hétig az első és 5 hétig a második kísérlet indítása előtt. A maláta melléktermékét négyszeres mennyiségű ioncserélt vízben forraltuk 45 percig, az így nyert vizes extraktumot szűrőpapíron átszűrtük, és ezt használtuk influensként 5-szörös hígításban. A folyadékot állandó áramlási sebességgel (2.7 ml/h), perisztaltikus pumpa segítségével vittük fel az oszlopokra, melyeknek töltete a micéliummal átszőtt malátakeverék volt. Az effluensből vett mintákban határoztuk meg az enzimaktivitások és a pH alakulását.

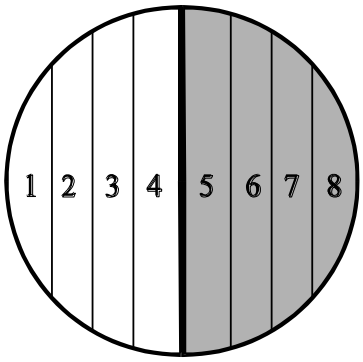
A **3-as számú rendszerben** a malátakeveréket 200 mm átmérőjű Petri csészékben oltottuk le 5 párhuzamosban. 3 hét elteltével, amikor a micélium teljesen benőtte a keveréket, steril szike segítségével feldaraboltuk a tenyészetet kb 2x2 cm-es darabokra, majd a csészékbe 30-30 ml vizes malátaextraktumot öntöttünk olyan módon, hogy az a micéliummal átszőtt keverék alá került, így a kultúra a levegővel érintkezett. (Az extraktumot az előző kísérleti rendszerben influensként használt folyaddékkal azonos módon készítettük.) 3-4 naponta mintát vettünk a folyadékfázisból, és meghatároztuk az enzimaktivitásokat. 10-11 naponként a folyadékfázist friss extraktumra cseréltük.

3.3.2. Trichoderma *metabolitok hatása az enzimtermelésre*

A felhasznált *Trichoderma* törzsek (*T. aureoviride* T122, *T. harzianum* T66, *T. viride* T124) a SzTE Mikrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményéből származtak.

A kísérletek során azt a táptalajt használtuk, mely a 2. fejezetben leírtak szerint a micélium növekedése szempontjából optimálisnak bizonyult (15 g/l malátaextraktum, 3 g/l keményítő, 20 g/l tölgyfaforgács).

Az **1. számú kísérletben** a *L. edodes* enzimek termelődési mintázatának megváltozását vizsgáltuk aktívan növekvő *Trichoderma* micéliummal való interakció esetén. A lemezek (90 mm átmérő, 20 ml táptalaj/lemez) inokulálása a 2.2.2. pontban leírtaknak megfelelően történt, a lemez szélétől kb. 2 cm távolságban. A *Trichoderma* törzseket hasonlóképpen oltottuk le, a *L. edodes* telep leoltási helyétől 5 cm-re, az azt követő 6. napon. A mintavétel 3 nappal később történt, ekkorra a *L. edodes* és a *Trichoderma* telepek széle összenőtt, és mindkettő a táptalaj felületének megközelítőleg a felét foglalta el. Az agarlemezt 8 sávra vágtuk fel, a telepek határvonalával párhuzamos irányban (3/4. ábra). A mintákat megszámoztuk a *L. edodes* telep külső szélén levő sávtól kezdve 1-től 8-ig. A két telep határvonala a 4. és 5. sáv között helyezkedett el. A kontroll lemezeken csak *L. edodes* micéliumot növesztettünk 9 napig, majd a telep által befedett agarat 4 sávra vágtuk fel, ahogy a fenti esetben a lemez *L. edodes*-oldalát. (Olyan kontroll mintára, melynél a lemezen csak *Trichoderma* telep növekedett, azért nem volt szükség, mivel a *Trichoderma* a vizsgált enzimeket nem termeli.)



3/4. ábra.
Az agarlemezből a mintavétel során kivágott 8 sáv pozíciója az 1. sz. kísérletben.

A további két kísérlet célja a *Trichoderma* által termelt metabolitok enzimindukciós hatásának vizsgálata volt. A kísérletekhez szükséges *Trichoderma* fermentlé előállítása a következőképpen történt: 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban 50-50 ml tápoldatot inokuláltunk (10^5 konídium/ml), a micéliumot rázatott folyadékkultúrában növesztettük (200 rpm, 25 °C, 5 nap). Az indukált minták esetén a tápfolyadék összetétele a következő volt: 5 g/l KH_2PO_4, 1 g/l $NaNO_3$, 1 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_20$, 1 g/l mannitol és inducerként 2 g/l porított *L. edodes* micélium; a nem indukált mintáknál a tápfolyadék szénforrásként kizárólag 3 g/l mannitolt tartalmazott, *L. edodes* micéliumot nem. Centrifugálással (16 000 g, 10 perc) elkülönítettük a felülúszót a micéliumtól, majd liofilizálás segítségével tízszeresére töményítettük. A kétféle (indukált és nem indukált), betöményített fermentléminta egyik felét Whatman Puradisc 13 PVDF fecskendőszűrő segítségével sterilre szűrtük, másik felét autoklávozással sterilizáltuk (115 °C, 30 perc).

Az indukált minták tápfolyadékához használt *L. edodes* micéliumot folyadékkultúrában állítottuk elő. 100 ml tápfolyadékot (20 g/l glükóz, 10 g/l pepton, 2 g/l élesztőextraktum; pH 6.6) oltottunk le micéliummal benőtt agarlemezből kivágott agarkorongokkal (5 db, 6 mm átmérő) 250 ml-es Erlenmeyer lombikban. A 3 hetes rázatott kultúra (25 °C, 160 rpm)

50 ml-ét használtuk fel inokulumként 500 ml médium leoltására 1 l-es Wheaton Celstir üvegekben. Öt hetes fermenetálás (25 °C, 180 rpm) után a micéliumot szűrőpapíron való szűréssel összegyűjtöttük, háromszor mostuk ioncserélt vízzel, vákuum alatt szárítottuk, majd folyékony nitrogénben porrá őröltük.

A **2. számú kísérletet** ugyanúgy végeztük, mint az elsőt, azzal a különbséggel, hogy a *Trichoderma* leoltása helyett az annak megfelelő helyen, a 6. napon 6 mm átmérőjű lyukat fúrtunk a táptalajba, és ezekbe a lyukakba a 6. és 7. napon 100-100 μl-t mértünk be a különböző eredetű és különböző módon sterilizált fermentlé-preparátumokból. A 9. napon az 1. számú kísérletben szereplő 4. sáv pozíciójának megfelelő helyről vettünk mintát a lemezekből. (A 4. sáv a *L. edodes* telep *Trichoderma* micéliummal érintkező részének felel meg.) A későbbiekben IF, IH, NF és NH betűkkel jelölt mintákat az indukált, sterilre szűrt; indukált, hősterilezett; nem indukált, sterilre szűrt és nem indukált, hősterilezett fermentlémintákat tartalmazó lemezekből vett agarmintákból extraháltuk.

A **3. számú kísérletben** kisméretű Petri-csészékben készítettünk lemezeket (35 mm átmérő, 3 ml táptalaj/lemez), melyek a betöményített *Trichoderma* fermentleveket 10-szeres hígításban tartalmazták. A *L. edodes* micéliummal történő leoltást követő 11 napos inkubáció után a teljes lemezt extraháltuk. A különböző fermentlé-preparátumokat tartalmazó lemezekből extrahált minták jelölése megegyezik a 2. számú kísérletnél leírtakkal.

3.3.3. Az enzimatikus folyamatok tápanyagfüggése

Az alaptáptalaj keményítőt (10 g/l), agarat (20 g/l) és a vizsgált festékek (Poly R-478, Orange II, RBBR) valamelyikét (0.15 g/l) tartalmazta. (Az előkísérletek során a keményítő a növekedéshez hasonlóan az enzimtermelés szempontjából is optimálisnak bizonyult, koncentrációjának emelése a táptalajban 10 g/l értékig növelte az enzimaktivitást.)

Elsőként a Poly R-478 lebontásának N-függését vizsgáltuk Mn-t (20 μM) tartalmazó táptalajon, három különböző N-forrás (NH_4Cl, pepton, malátaextraktum) jelenlétében, 0-25 mM N koncentráció-tartományban. A kísérlet eredményei alapján a másik két festék lebontásának N-függését 0-10 mM N mellett határoztuk meg, az Orange II esetében Mn (20 μM) hozzáadásával.

A Mn-függés és a természetes eredetű tápanyagok (tölgyfaforgács, szalma) hozzáadásának hatását a fenti kísérletek eredményei alapján mindhárom festék esetében malátaextraktumot (3.5 g/l, azaz 2 mM N) tartalmazó táptalajon végeztük. A Mn-t

$MnSO_4 \cdot H_2O$ formájában adtuk a táptalajhoz. A tölgyfaforgács és a szalma (→2.2.1.2.) 2 w/v % koncentrációban volt jelen az adott esetekben.

A táptalajok sterlizálása a 2.2.1.1. pontban, a lemezek inokulálása a 2.2.2. pontban leírtaknak megfelelően történt.

14 napos inkubációt követően lemértük a telepek és az elszíntelenített lebontási zónák (3/1. kép) átmérőjét mm-ben. Az enzimtermelés meghatározásához a Poly R-478 festéket tartalmazó agarakból vettünk mintát: lemezenként 4 db, 8 mm átmérőjű agarkorongot vágtunk ki a lebontási zóna széléről, illetve az annak megfelelő pozícióból, ha az adott táptalajon nem volt lebontás.

Az egy agarlemezből származó 4 db agarkorongot együtt, egy mintaként extraháltuk kétszeres mennyiségű ioncserélt vízzel (2 ml/g agar), dörzsmozsárban homogenizálva. Centrifugálás után (7 500 g, 10 perc) a felülúszóban mértük az enzimaktivitásokat (→3.3.5.).

A Poly R-478 lebontásának Mn-függése esetében hasonló módon mintát vettünk a leoltás helye mellett is, azzal a céllal, hogy a lebontás mértékét az $OD_{520/350}$ arány segítségével határozzuk meg (Field és mtsai 1992). Ezeket a mintákat ugyanúgy extraháltuk, mint az enzimtermelés meghatározásához vett agarmintákat.

3.3.4. Nehézfémek hatása az enzimtermelésre

A növekedésgátlási kísérletekben (→2.2.1.3., 2.3.3.) vizsgált nehézfémek MnP-termelésre és festékbontásra gyakorolt hatását a 3.4.3. pontban leírt eredmények alapján keményítőt (10 g/l), malátaextraktumot (3.5 g/l) és Poly R-478 festéket (0.15 g/l) tartalmazó tápalajon vizsgáltuk, 20%-os növekedésgátlást okozó koncentrációjuk mellett (3/7. táblázat). A Mn-t mint nehézfémet tartalmazó táptalaj kivételével a táptalajokhoz Mn-t (20 μM) is adtunk, mint a MnP szubsztrátját. A táptalajok sterilizálása a 2.2.1.1. pontban, a lemezek inokulálása a 2.2.2. pontban leírtaknak megfelelően történt. 15 napos inkubáció után lemértük a lebontási zónák átmérőjét mm-ben, és mintát vettünk az agarból a leoltás helye mellől a MnP-aktivitás meghatározása céljából.

Az *in vitro* enzimaktivitás gátlásának meghatározásához a méréseket (→3.3.5.) a vizsgált nehézfémek jelenlétében végeztük, 0.01-20 mM tartományban. Az 50%-os gátlást okozó koncentrációt a 2.2.2. pontban leírtak szerint határoztuk meg.

3.3.5. Az extracelluláris enzimaktivitások mérése

Az enzimaktivitásokat spektrofotometriás úton határoztuk meg. A reakcióelegy végső térfogata minden esetben 2 ml volt, mely 100 μl agarból extrahált mintát tartalmazott.

A Lcc-aktivitást a 2,2'azino-bis(3-etilbenztiazolin)-6-szulfonát (ABTS) szubsztrát oxidációja útján határoztuk meg (Wolfenden és Willson 1982). A reakcióelegy 0.3 mM ABTS-t tartalmazott nátrium-malonát pufferben (50 mM, pH 4.5). Az oxidáció a 420 nm-en mért OD-növekedés (ε_{420}=36 000 /M cm) segítségével volt követhető.

A MnP-aktivitás mérése során használt reakcióelegy szubsztrátként 0.5 mM mangánt tartalmazott $MnSO_4 \cdot H_2O$ formájában, nátrium-malonát pufferben (50 mM, pH 4.5). Az enzimreakciót 10 μl H_2O_2 hozzáadásával indítottuk; a H_2O_2 végső koncentrációja 0.4 mM volt. A Mn(III)-malonát komplex képződése a 270 nm-en mért OD-növekedés (ε_{270}=11 590/M cm) segítségével követhető nyomon (Wariishi és mtsai 1992).

Az enzimaktivitásokat U/l egységben adtuk meg. Egy U az az enzimmennyiség, mely 1 μmol szubsztrát 1 perc alatt, szobahőmérsékleten történő oxidációjához szükséges.

3.3.6. Az adatok statisztikai analízise

A kísérleteket -néhány, az adott kísérlet leírásánál külön megemlített esetet kivéve- három párhuzamosban végeztük. A táblázatokban és az ábrákon feltüntetett számszerű eredmények az ebből származó adatok átlagai illetve szórásai. A szignifikancia-vizsgálatokat a 2.2.2. pontban leírtaknak megfelelően végeztük.

3.3.7. Anyagok

A malátaextraktum Scharlau Chemie, az ABTS, a Poly R-478 és a RBBR Sigma, az Orange II (Tropaeolin 000 No. 2) Fluka, az összes többi vegyszer Reanal beszerzésű volt.

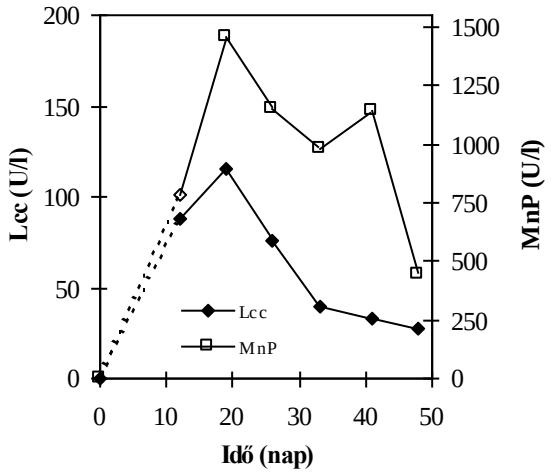
3.4. Eredmények és értékelésük

3.4.1. Enzimtermelés a sörgyártás során keletkezõ maláta melléktermékén

3.4.1.1. Eredmények

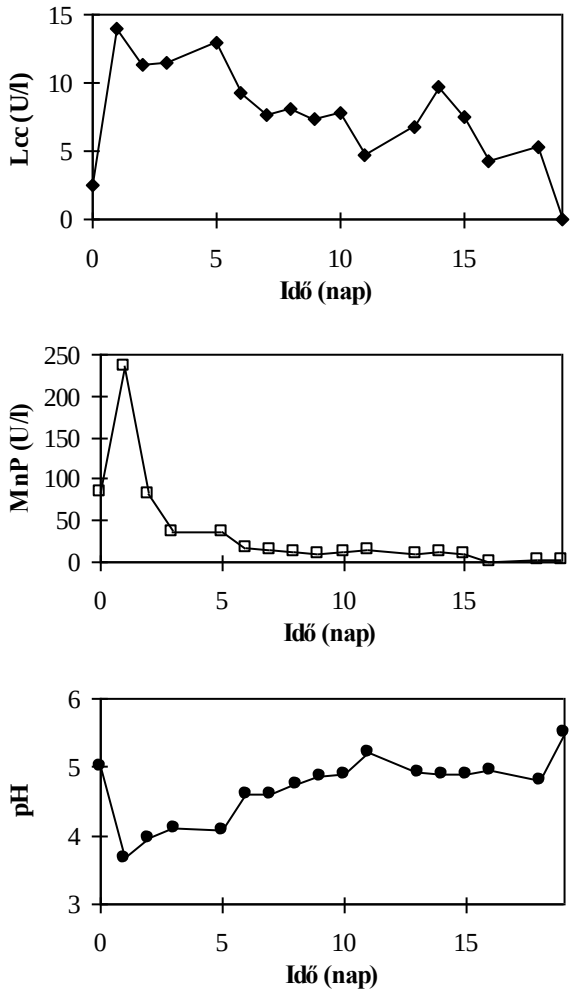
A *L. edodes* extracelluláris enzimtermelését sörgyári maláta melléktermékén három különböző rendszerben vizsgáltuk (→3.3.1.).

A 3/5. ábrán az **1-es számú rendszer** mintáinak enzimaktivitása látható. Az akitvitás maximuma mindkét enzim esetében körülbelül egy héttel azután volt megfigyelhető, hogy a micélium teljesen átszőtte a keveréket. Igen magas aktivitási értékeket tapasztaltunk, ez bizonyítja, hogy a maláta melléktermék alkalmas táptalaj extracelluláris enzimek termelésére, viszont maga a rendszer nem használható folyamatos enzimtermelésre. Ezt kíséreltük meg megvalósítani a **2-es számú rendszerben**. Az átfolyós rendszerű oszlopreaktorokkal végzett első kísérlet eredménye a 3/6. ábrán látható. Mindkét enzim aktivitása csökkenő tenden-ciát mutatott a kísérlet során; a 19. napon már egyik aktivitás sem volt mérhető az effluensben. A legmagasabb érték is egy nagyságrenddel kisebb volt, mint az előző rendszer mintáinak aktivitása. Az első három napon mért viszonylag nagy mennyiségű MnP valószínűleg nem ezalatt a periódus alatt termelődött, hanem a micélium növekedése során a szilárd fázison termelt enzimmennyiség kimosódá-sának tulajdonítható.



3/5. ábra

Az 1-es számú rendszer mintáinak enzim-aktivitása. (A szaggatott vonal azt az első mintavétel előtti, 12 napos periódust jelöli, mialatt a micélium benőtte a keveréket.)

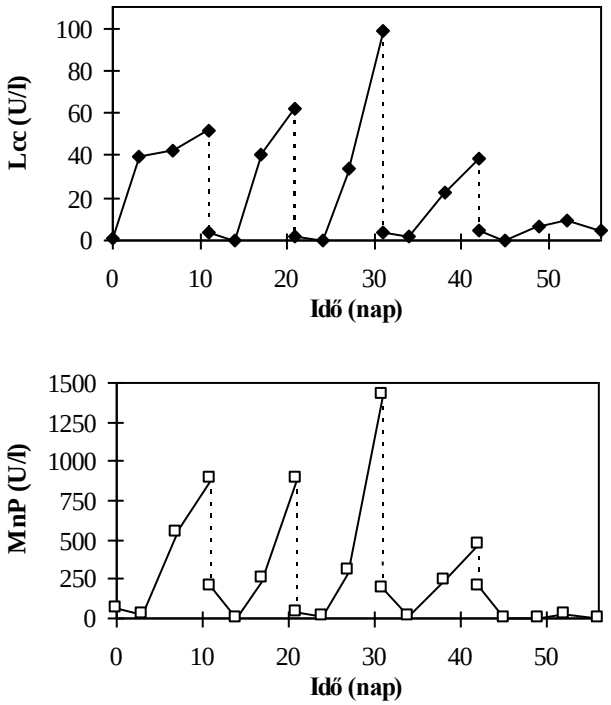


3/6. ábra

Az enzimaktivitások és a pH alakulása a
2-es számú rendszerben.

A második kísérlet során, melynél indításkor a töltetet alkotó kultúra 3 héttel idősebb volt, nagyon hasonló eredményeket kaptunk. A rendszer egyik enzim folyamatos előállítására sem bizonyult alkalmasnak.

A **3-as számú rendszernél** az enzimek akitvitását szintén a folyadékfázisban mértük, mely a micéliummal átszőtt malátakeverék alatt helyezkedett el, így a kultúra a levegővel érintkezett. A 3/7. ábrán látható eredmények azt mutatják, hogy ez a típusú rendszer alkalmas lehet folyamatos enzimtermelésre, mivel 10-11 naponként magas Lcc- és MnP-aktivitású fermentlé volt nyerhető. A 45. nap után tapasztalt lecsengés valószínűleg a kultúra "elöregedése" miatt következett be.



3/7. ábra

A 3-as számú rendszer mintáinak enzimaktivitása. (A szaggatott vonalak a tápfolyadékcsere előtt és után mért értékeket kötik össze.)

3.4.1.2. Az eredmények értékelése

Bioremediációs alkalmazási lehetőségeik miatt (Bumpus és mtsai 1985; Shah et al 1992; Barr és Aust 1994) a WRF csoport enzimeinek nagy mennyiségben történő előállítása igen nagy jelentőséggel bír. A *L. edodes* által termelt Lcc és MnP bizonyítottan felhasználható bioreaktorokban, immobilizált formában környezetszennyező anyagok, főleg fenol-származékok aspecifikus oxidációjára (Grabski és mtsai 1996; Grabski és mtsai 1998; D'Annibale és mtsai 1999; D'Annibale és mtsai 2000). Az ilyen eljárások során az ipari és

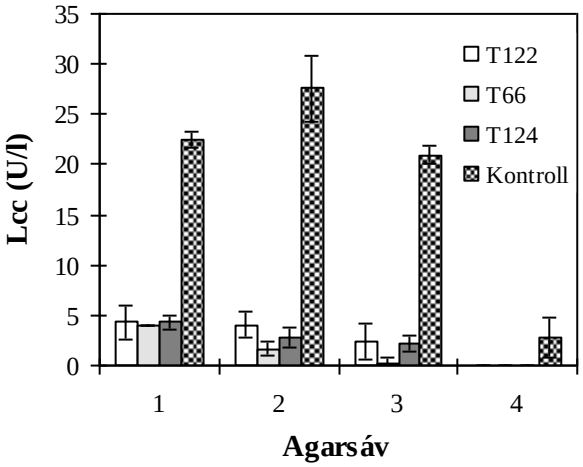
mezőgazdasági melléktermékek szubsztrátként való felhasználása jelentősen csökkentheti az enzimek előállításának költségeit. A sörgyártás során keletkező maláta melléktermék mind a *L. edodes* micélium növekedése, mind extracelluláris enzimtermelése szempontjából kiváló szubsztrátnak bizonyult.

A *L. edodes* enzimtermelését három különböző kísérleti elrendezésben vizsgáltuk. Az optimálisnak bizonyult rendszer továbbfejlesztéseként tervezhető olyan átfolyós üzemmódú bioreaktor, melyben nemcsak a folyamatos enzimtermelés lehetne megoldott, hanem segítségével vizsgálható lenne a maláta melléktermékeken növesztett *L. edodes* micélium alkalmazhatósága vízben oldható környezetszennyező anyagok lebontására, és ezáltal különböző szennyvizek remediálására.

3.4.2. Trichoderma *metabolitok hatása az enzimtermelésre*

3.4.2.1. Eredmények

Az **1. számú kísérletben** a *L. edodes* enzimek termelődési mintázatának megváltozását vizsgáltuk aktívan növekvő *Trichoderma* micéliummal való interakció során. Azoknak a lemezeknek a mintáiban, ahol a *L. edodes* micélium antagonista interakcióban állt a *Trichoderma* micéliummal, MnP-aktivitás egyáltalán nem volt mérhető, és a Lcc-aktivitás is jóval alacsonyabb értékeket mutatott a kontroll lemezekről származó mintákhoz képest (3/8. ábra). (A kontroll lemezek 1, 2, 3 és 4 mintáiban 137±9 U/l, 96±18 U/l, 32±12 U/l, 0 U/l MnP-aktivitást mértünk.) Ezek az eredmé-nyek arra utalnak, hogy az erős kompetitor organizmus a mintavétel időpontjára már jelentősen visszaszorította a *L. edodes* enzimtermelését, annak ellenére, hogy a *Trichoderma* micélium még nem nőtte be a *L. edodes* telepet. (A *Trichoderma* telep oldaláról származó 5-8 mintákban egyik enzimaktivitás sem volt jelen.)



3/8. ábra

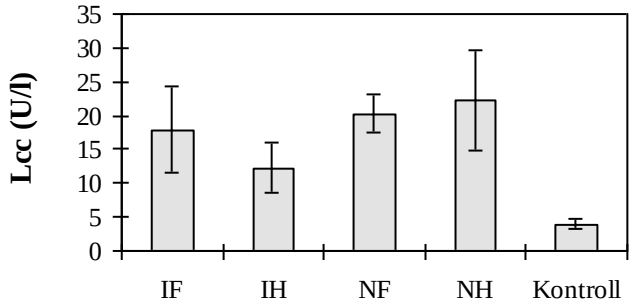
A Lcc-aktivitások alakulása a *L. edodes* telepen belül, aktívan növekvő *Trichoderma* micéliummal való interakció esetén (1. számú kísérlet).

Mivel a *L. edodes* enzimeinek irodal-mi adatok által alátámasztott indukcióját aktívan növekvő *Trichoderma*

micélium mellett nem sikerült kimutatni, a további kísérletekben a *Trichoderma* által termelt metabolitok enzimtermelésre kifejtett hatását tanulmányoztuk. Megfigyeléseink alapján a *T. viride* T124 törzs (3/2. kép) bizonyult a legerősebb antagonistának, ezért ezeket a kísérleteket ennek a törzsnek a folyadékkultúrájából származó fermentlémintákkal végeztük. A fermentlémintákat tartalmazó táptalajokon a *L. edodes* micélium növekedése nem tért el a kontroll táptalajon tapasztalható növekedésétől.

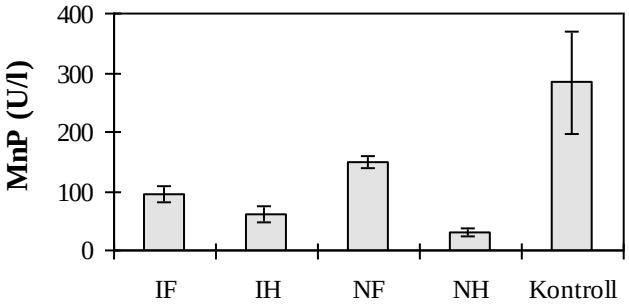
3/2. kép

L. edodes micélium növekedését visszaszorító, aktívan növekvő *Trichoderma* micélium (*T. viride* T124 törzs).



3/9. ábra

A *L. edodes* micélium Lcc-termelésének alakulása *Trichoderma* fermentlé különböző preparátumainak jelenlétében.



3/10. ábra

A *L. edodes* micélium MnP-termelésének alakulása *Trichoderma* fermentlé különböző preparátumainak jelenlétében.

A **2. számú kísérlet** mind a négy mintájában a Lcc-aktivitás szig-nifikánsan magasabb volt, mint a kontrollban (3/9. ábra), ez a Lcc enzim *Trichoderma* metabolitok ál-tali indukciójára utal. Az IF és IH, az NF és NH, valamint az IF és NF minták között a különbség nem szig-nifikáns, tehát az indukcióért felelős komponens hőstabil, és a nem indu-kált fermentlében is jelen van.

MnP-aktivitás nemcsak a *Trichoderma* fermentlevet tartalmazó agarakból származó mintákban, hanem a kontroll mintákban sem volt kimérhető, hasonlóan az 1. számú kísérlet kontroll lemezeinek 4. sáv-jához. A *Trichoderma* metabolitok MnP-termelésre gyakorolt hatását a **3. számú kísérlet** során mutattuk ki (3/10. ábra). A MnP-aktivitás mind a négy mintában szignifikánsan alacso-nyabb volt, mint a kontroll mintában. A szignifikancia-vizsgálatok alapján a gátlóhatásért felelős komponens hőstabilnak bizonyult, illetve szintén jelen van a nem indukált *Trichoderma* fermentlében is. A Lcc enzim szempontjából a 3. számú kísérlet eredményei teljesen hasonlóak voltak a 2. számú kísérletnél leírtakhoz.

3.4.2.2. Az eredmények értékelése

Az aktívan növekvő *Trichoderma* micélium erősen visszaszorította a *L. edodes* extracelluláris enzimtermelését (1. számú kísérlet). Ennek oka az lehet, hogy a mintavétel időpontjában a *Trichoderma* sejtfalbontó és proteolitikus enzimeinek hatására már megindult a *L. edodes* micélium és az általa termelt extracelluláris enzimek degradációja. A MnP-aktivitás

gátlásában a *L. edodes* telep felé diffundáló *Trichoderma* metabolitok is részt vehetnek, erre utal a 3. számú kísérlet eredménye.

A *Trichoderma* metabolitok indukálták a *L. edodes* Lcc-termelését, viszont csökkentették a MnP-termelést (2. és 3. számú kísérlet); ez a megfigyelés összhangban áll az irodalmi adatokkal (Savoie és mtsai 1998; Savoie és Mata 1999). Mivel a micélium növekedését tekintve nem volt különbség a *Trichoderma* fermentlémintákat tartalmazó táptalajok és a kontroll között, az alacsony MnP-aktivitás nem magyarázható a kisebb mennyiségű biomassza jelenlétével. Az aktivitásokat befolyásoló hatásért felelős komponensek mindkét enzim esetében hőstabilnak bizonyultak, és a nem indukált *Trichoderma* fermentlében is jelen voltak, tehát folyadékkultúrában való termelődésükhöz a *L. edodes* micélium jelenléte nem szükséges. A Lcc enzim esetében a *Trichoderma* metabolitok általi indukció arra utal, hogy az enzim szerepet játszhat a védekezésben mikoparazita gombákkal szemben.

A *Trichoderma* metabolitokról számos esetben kimutatták, hogy növekedésgátló hatásúak különböző gombatörzsekkel szemben, ez lehetővé teheti alkalmzásukat a megelőző biológiai védekezésben a faanyag korhadását okozó gombák (*Lentinus lepideus, Fomes annosus*) ellen pl. villanypóznák (Bruce és King 1983; Bruce és King 1984) vagy frissen vágott fenyőfa esetén (Schoeman és mtsai 1996). Amint azt eredményeink a MnP esetében megmutatták, bizonyos enzimek termelődésének visszaszorítása szerepet játszhat a védőhatás mechanizmusában.

A WRF csoportba tartozó gombák által termelt Lcc enzim széles körben alkalmazható bioremediációs célokra (Rodriguez és mtsai 1999; Ullah és mtsai 2000). A *Trichoderma* metabolitok indukciós hatásuknál fogva felhasználhatóak lehetnek a Lcc enzim ilyen célra nagy mennyiségben történő előállítása során az enzimtermelés mértékének növelésére.

3.4.3. Az enzimatikus folyamatok tápanyagfüggése

3.4.3.1. Eredmények

A táptalaj N-koncentrációjának változtatása minden vizsgált paraméterre hatással volt. A Poly R-748 lebontásának N-függésére és az ezeken a táptalajokon tapasztalt növekedésre vonatkozó adatok a 3/2. táblázatban láthatók.

A 2. fejezetben leírt eredményekkel összhangban a legjobb növekedést a malátaextraktum biztosította, főleg 4 mM feletti N-koncentrációk esetén. A leggyorsabb teljes lebontás az egyes N-forrásoknál 1 mM NH_4Cl-N mellett 18 nap alatt, 1 mM pepton-N mellett 21 nap alatt és 2 mM malátaextraktum-N mellett 17 nap alatt ment végbe.

A Mn-t különböző koncentrációban tartalmazó táptalajokon a lebontási zónák egyforma méretűek voltak, de a lebontás mértéke szemmel láthatóan különbözött: a táptalaj színe élénksárga helyett narancsszínű volt 10 μM alatt és 50 μM felett. Ennek a részleges lebontásnak a számszerű leírására az $OD_{520/350}$ arány segítségével került sor (Field és

3/2. táblázat. Növekedés és festéklebontás a Poly R-478 festéket és a háromféle N-forrást különböző koncentrációban tartalmazó táptalajokon.

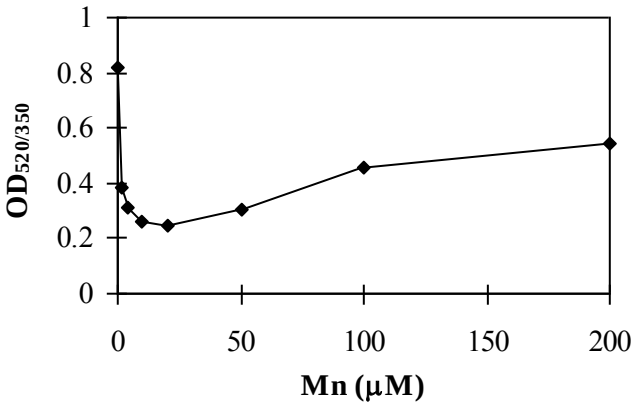
	Telepátmérő (mm)			Lebontási zóna átmérője (mm)		
Nitrogén (mM)	NH_4Cl	Pepton	Maláta-extraktum	NH_4Cl	Pepton	Maláta-extraktum
0	43 ± 4	43 ± 4	43 ± 4	35 ± 3	35 ± 3	35 ± 3
1	78 ± 2	60 ± 0	78 ± 3	60 ± 1	52 ± 0	60 ± 4
2	81 ± 5	62 ± 4	79 ± 4	54 ± 7	48 ± 3	64 ± 1
3	76 ± 4	65 ± 6	85 ± 5	52 ± 5	48 ± 9	54 ± 8
4	75 ± 4	70 ± 9	90 ± 0	51 ± 1	49 ± 10	47 ± 2
5	72 ± 6	75 ± 6	(1)	49 ± 4	49 ± 8	(2)
6	76 ± 5	62 ± 0		52 ± 3	(2)	(2)
8	76 ± 5	58 ± 6		(2)	(3)	(3)
10	80 ± 0	57 ± 12		(2)		
12	80 ± 5	58 ± 6		(3)		
14	82 ± 3	55 ± 0				
20	81 ± 1	57 ± 3				
25	76 ± 1	57 ± 3				

(1) A micélium a lemez teljes felületét benőtte 14 nap alatt ilyen, vagy ennél magasabb koncentráció esetén.

(2) Gyenge lebontás volt tapasztalható, éles határvonalú sárga zónák nem jelentek meg.

(3) Nem volt lebontás ilyen, vagy ennél magasabb koncentráció esetén.

Az árnyékolással jelölt adatok a legintenzívebb lebontásra utaló maximális átlagértékeket emelik ki az adott N-forrás esetén.



3/11. ábra

$OD_{520/350}$ arány a Mn-t különböző koncentrációban tartalmazó táptalajokból származó mintákban.

mtsai 1992). A 3/11. ábrán feltüntetett eredmények alapján 20 μM Mn bizonyult optimálisnak a Poly R-478 lebontása szempontjából.

A természetes eredetű tápanyagok hozzáadása pozitív hatással volt a Poly R-478 lebontására (3/3. táblázat); az összes vizsgált táptalaj közül a malátaextraktumot és tölgyfaforgácsot tartalmazó táptalajon volt a leggyorsabb a lebontás. (Mivel ezek a komplex tápanyagok viszonylag nagy mennyisében tartalmaznak Mn-t, annak hozzáadása szükségtelen volt.)

A másik két festék lebontásának N-függésével kapcsolatos adatok a 3/4. táblázatban szerepelnek. Egyik festék sem gátolta a növekedést az alkalmazott koncentrációban; a telepméretek hasonlóak voltak a Poly R-478 festéket tartalmazó táptalajon mértekhez.

Az Orange II festék lebontására vonatkozó eredmények nagyon hasonlóak voltak a Poly R-478-nál tapasztaltakhoz: (1) mindhárom N-forrás esetén 1-3 mM N mellett volt leggyorsabb a lebontás; (2) a lebontási zóna a 2 mM malátaextraktum-N-t tartalmazó táptalajon volt a legnagyobb; (3) 8 mM N felett lebontás egyáltalán nem volt megfigyelhető egyik N-forrásnál sem. A leggyorsabb teljes lebontás az egyes N-forrásoknál 1 mM NH_4Cl-N illetve 3 mM pepton-N mellett 19 nap alatt és 2 mM malátaextraktum-N mellett 17 nap alatt ment végbe.

3/3. táblázat. Poly R-478 lebontása malátaextraktumot (ME) és/vagy egyéb kiegészítéseket (TF=tölgyfaforgács; SZ=szalma) tartalmazó táptalajokon.

Tápanyagok[ˇ]			Lebontási zóna	Teljes lebontás
ME	TF	SZ	(mm)	(nap)
-	-	-	35 ± 1	26
+	-	-	64 ± 1	17
-	+	-	82 ± 2	16
+	+	-	84 ± 2	15
-	-	+	80 ± 1	16
+	-	+	75 ± 1	17

[ˇ]A + és - jelek azt jelzik, hogy az adott komponens jelen volt -e táptalajban.

Az árnyékolással jelölt sor a legintenzívebb lebontásra utaló átlag-értékeket és az ezt eredményező táptalajösszetételt emeli ki.

3/4. táblázat. Orange II és RBBR lebontása a háromféle N-forrást külön-böző koncentrációban tartalmazó táptalajokon (ME=malátaextraktum).

Nitrogén	Lebontási zóna átmérője (mm)					
(mM)	Orange II			RBBR		
	NH_4Cl	Pepton	ME	NH_4Cl	Pepton	ME
0	42 ± 1	42 ± 1	42 ± 1	52 ± 4	52 ± 4	52 ± 4
1	57 ± 5	49 ± 4	63 ± 0	68 ± 4	54 ± 2	70 ± 0
2	50 ± 0	51 ± 0	67 ± 7	68 ± 4	64 ± 5	75 ± 0
3	48 ± 4	51 ± 0	62 ± 2	63 ± 1	52 ± 2	63 ± 4
5	(1)	51 ± 3	(1)	60 ± 0	50 ± 7	(3)
8	(1)	(1)	(2)	54 ± 5	46 ± 1	(3)
10	(2)	(2)	(2)	54 ± 9	(3)	(3)

(1) Gyenge lebontás volt tapasztalható (a táptalaj színe halvány narancssárga volt a leoltás helye körül, de nem voltak pontosan lemérhető, éles határvonalú zónák).

(2) Nem tapasztalható lebontás.

(3) A lebontás kisebb mértékű, mint alacsonyabb N-koncentrációknál; a zónák határa elmosódik, átmérőjük nem mérhető pontosan.

Az árnyékolással jelölt adatok a legintenzívebb lebontásra utaló maximális átlagértékeket emelik ki az adott N-forrás esetén.

Ahogy a másik két festéknél, az RBBR esetében is 2 mM malátaextraktum-N mellett volt a leggyorsabb a lebontás (3/4. táblázat). A másik két festéknél tapasztaltakkal ellentétben a lebontást a magas N-koncentráció (8-10 mM) nem gátolta teljes mértékben. A leggyorsabb teljes lebontás az egyes N-forrásoknál 1 mM NH_4Cl-N illetve 2 mM malátaextraktum-N mellett 20 nap alatt és 2 mM pepton-N mellett 23 nap alatt ment végbe.

A Mn-koncentráció változtatása 5-200 μM tartományban nem volt hatással az Orange II lebontására. (A Poly R-478-nál tapasztalt részleges lebontás nem volt megfigyelhető.) A Mn-t nem tartalmazó táptalajon nem következett be lebontás. Az RBBR esetében a Mn jelenléte egyáltalán nem befolyásolta a lebontást, melynek mértéke ugyanakkora volt Mn nélkül, mint magas Mn-koncentráció (200 μM) mellett.

A természetes eredetű tápanyagok hozzáadásának hatását a 3/5. táblázat adatai szemléltetik. Az Orange II lebontására a tölgyfaforgács a Poly R-478 esetében tapasztaltakhoz képest kisebb mértékű pozitív hatással volt, a szalmának viszont nem volt ilyen hatása. Az RBBR lebontását mindkét kiegészítés serkentette.

Az extracelluláris enzimek termelődésének tápanyagfüggését a Poly R-478 festéket tartalmazó táptalajokból vett mintákban vizsgáltuk. A Lcc- és MnP-termelés N-függésére vonatkozó adatok a 3/12. ábrán láthatók. A legmagasabb Lcc-aktivitásokat a 2-5 mM N-t tartalmazó táptalajokból származó mintákban mértük. Az NH_4Cl és a pepton esetében a legmagasabb MnP-aktivitások 1-2 mM N mellett voltak mérhetők. Az összes mintát tekintve

3/5. táblázat. Orange II és RBBR lebontása malátaextraktumot (ME) és/vagy egyéb kiegészítéseket (TF=tölgyfaforgács; SZ=szalma) tartalmazó táptalajokon.

Tápanyagok[*]			Lebontási zóna (mm)		Teljes lebontás (nap)	
ME	TF	SZ	Orange II	RBBR	Orange II	RBBR
-	-	-	42 ± 1	52 ± 4	26	24
+	-	-	67 ± 7	75 ± 0	17	20
-	+	-	54 ± 5	80 ± 14	18	16
+	+	-	65 ± 7	90 ± 0	18	14
-	-	+	40 ± 0	60 ± 7	23	21
+	-	+	50 ± 0	70 ± 0	19	21

[*]A + és - jelek azt jelzik, hogy az adott komponens jelen volt -e táptalajban.

Az árnyékolással jelölt adatok a legintenzívebb lebontásra utaló átlagértékeket és az ezt eredményező táptalajösszetételt emelik ki az adott festékanyag esetén.

a MnP-aktivitás 3 mM malátaextraktum-N mellett volt maximális. A Lcc-termelés szempontjából a pepton, a MnP-termelés szempontjából a malátaextraktum bizonyult a legjobb N-forrásnak: 6 mM N-koncentrációig (mely 10.5 g/l malátaextraktumot jelent) a MnP-aktivitások magasabbak voltak, mint a másik két N-forrás esetén bármely koncentrációnál. 12 mM NH_4Cl-N, 5 mM pepton-N és 8 mM malátaextraktum-N feletti koncentrációk mellett MnP-aktivitás nem volt kimérhető.

Az enzimtermelés Mn-függésére vonatkozó adatok a 3/13. ábrán láthatók. A MnP-aktivitás 2 μM Mn mellett volt maximális. Érdekes módon a Lcc enzim termelődése is bizonyos koncentráció-függést mutatott: 10 μM felett magasabb aktivitásokat tapasztaltunk.

A 3/6. táblázat adatai azt mutatják, hogy a természetes eredetű tápanyagok hozzáadása nagymértékben serkentette a MnP-termelést, viszont a Lcc-termelésre nem volt hatással. A kiegészítés hatására a MnP-aktivitás a csak keményítőt tartalmazó táptalaj esetén mintegy 10-szeresére, a malátaextraktumot is tartalmazó táptalaj esetén 4-szeresére nőtt.

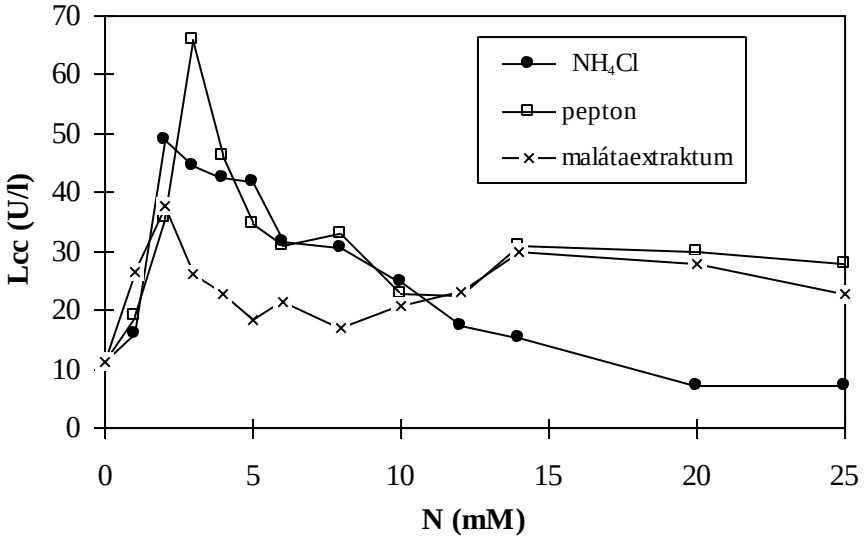
Minden vizsgált paramétert figyelembe véve a keményítőt (10 g/l), malátaextraktumot (3.5 g/l) és tölgyfaforgácsot (20 g/l) tartalmazó táptalaj bizonyult optimálisnak a *L. edodes* vizsgált enzimatikus folyamatai szempontjából.

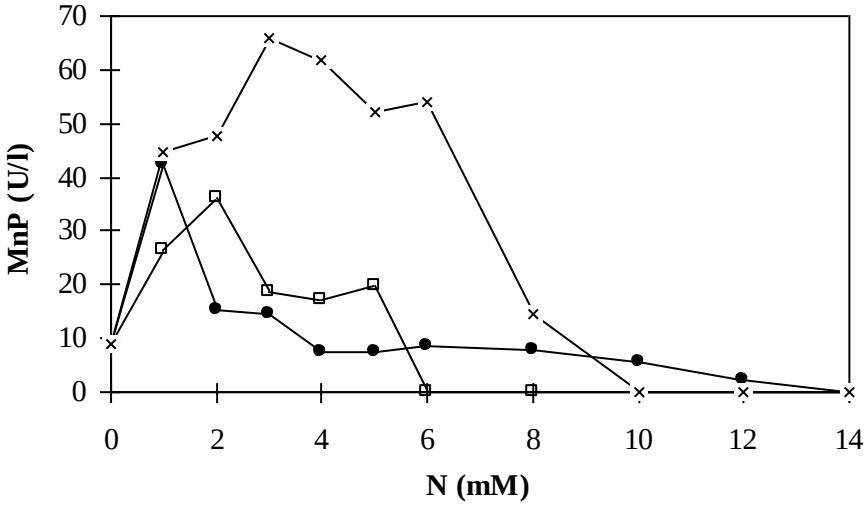
3/6. táblázat. Enzimteremlés malátaextraktumot (ME) és/vagy egyéb kiegészítéseket (TF=tölgyfaforgács; SZ=szalma) tartalmazó táptalajokon.

Tápanyagok[y]			Enzimaktivitás (U/l)	
ME	TF	SZ	Lcc	MnP
-	-	-	11 ± 1	9 ± 1
+	-	-	38 ± 2	48 ± 10
-	+	-	8 ± 1	141 ± 7
+	+	-	37 ± 0	194 ± 17
-	-	+	8 ± 1	94 ± 28
+	-	+	9 ± 1	178 ± 4

[y]A + és - jelek azt jelzik, hogy az adott komponens jelen volt -e táptalajban.

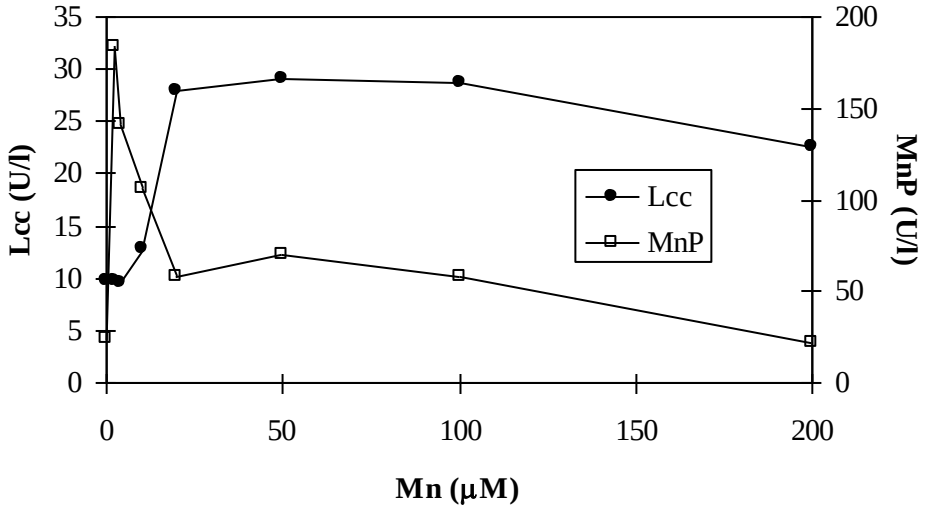
Az árnyékolással jelölt adatok a legintenzívebb enzimtermelésre utaló átlagértékeket és az ezt eredményező táptalajösszetételt emelik ki.





3/12. ábra

Extracelluláris enzimtermelés NH_4Cl (●), pepton (□) és malátaextraktum (x) különböző koncentrációi mellett.



3/13. ábra.

Extracelluláris enzimtermelés különböző Mn-koncentrációk mellett

3.4.3.2. Az eredmények értékelése

A fakorhasztó gombák enzimtermelését a rendelkezésre álló N-források minősége és mennyisége nagymértékben befolyásolja, nincs azonban általános érvényű összefüggés a táptalaj N-tartalma és a termelt enzimek mennyisége között. Bizonyos fajok esetében a magas N-koncentráció (25-60 mM) gátolja az enzimtermelést. A *Phanerochaete chrysosporium* a legismertebb példa erre a fajta szabályozásra (Keyser és mtsai 1978; Fenn és Kirk 1981; Leatham és Kirk 1983; Faison és Kirk 1985), és ugyanebbe a típusba tartozik a *Pleurotus sajor-caju* (Zhao és mtsai 1996; Fu és mtsai 1997), a *Trametes* (*Coriolus*) *versicolor* (Leatham és Kirk 1983; Zhao és mtsai 1996), a *Phlebia radiata* (Zhao és mtsai 1996) és a *Phlebia brevispora* (Leatham és Kirk 1983). Ezek a fajok alacsony N-koncentráció (2-3 mM) mellett magasabb enzimaktivitást mutatnak. Más fajok, mint például a *Bjerkandera adusta* (Kaal és mtsai 1993; Kaal és mtsai 1995), a *Pleurotus ostreatus* (Leatham és Kirk 1983; Kaal és mtsai 1995) és a *Ceriporiopsis subvermispora* (Ruttimann-Johnson és mtsai 1993) esetében a magas N-koncentráció nem gátolja, sőt, inkább serkenti az enzimtermelést. Ez azonban nem tekinthető a különböző N-igények szerinti egyértelmű csoportosításnak: még a *P. chrysosporium* enzimtermelését is (mely egyébként a legrészletesebben jellemzett faj a ligninolitikus folyamatok nagy mennyiségű N által történő gátlása szempontjából) serkentheti a magas N-koncentráció bizonyos növekedési feltételek mellett (Buswell és mtsai 1984; Kaal és mtsai 1995; Zhao és mtsai 1996). Az irodalmi adatok szerint a magas N-koncentráció a festéklebontást is gátolja a *P. chrysosporium* (Spadaro és mtsai 1992; Tatarko és Bumpus 1998) és a *T. versicolor* (Swamy és Ramsay 1999b; Kapdan és mtsai 2000) esetében.

A *L. edodes* enzimatikus folyamatainak N-függése az irodalmi adatok alapján nem határozható meg egyértelműen. A folyadékkultúrában növesztett micélium ligninolitikus aktivitására a magas N-koncentráció (25-60 mM) pozitív hatással volt (Leatham és Kirk 1983; Buswell és mtsai 1995). A szervetlen N-forrásként alkalmazott NH_4^+ magas koncentrációban (56 mM) meggátolta a növekedést, de ha a N pepton formájában volt jelen ugyanilyen mennyiségben, egy nagyságrenddel magasabb Lcc- és MnP-aktivitások voltak kimérhetők az alacsony N-tartalmú (2.2 mM NH_4^+) táptalajhoz képest (Kaal és mtsai 1995). Ezekkel az eredményekkel ellentétben szilárd táptalajon növesztett micélium esetében a MnP-aktivitás 22-szer magasabb volt alacsonyabb N-tartalom (2.6 mM) mellett (Zhao és mtsai 1996). Eredményeink szerint szilárd táptalajon mind az enzimtermelés, mind a festéklebontás szempontjából az alacsony N-koncentráció (<5 mM) bizonyult kedvezőnek, a N-forrás és a festékanyag minőségétől függetlenül. A Lcc-termelés kevésbé volt érzékeny a nagy

mennyiségű N jelenlétére: 10-25 mM N mellett viszonylag magas Lcc-aktivitást mértünk, míg a MnP-termelés, valamint a Poly R-478 és az Orange II lebontása szempontjából ilyen körülmények között teljes gátlás volt tapasztalható. Minden paramétert figyelembe véve a vizsgált N-források közül a malátaextraktum bizonyult optimálisnak. (A pozitív hatásért a N-tartalmú komonenseken és a maltózon kívül a malátaextraktum egyéb összetevői is felelősek lehetnek.) Mindhárom festék lebontása végbement a csak keményítőt tartalmazó táptalajon is, de szervetlen vagy szerves N-forrás hozzáadása alacsony koncentrációban (1-3 mM) jelentősen felgyorsította a folyamatot.

A táptalaj Mn-tartalma szintén befolyásolja az extracelluláris enzimek termelését. Folyadékkultúrában 20 μM bizonyult optimálisnak a *L. edodes* MnP-termeléséhez (Buswell és mtsai 1995). 273 μM Mn, mely 0-1.8 μM tartományban a maximális MnP-aktivitást biztosította a *P. sajor-caju* esetében (Fu és mtsai 1997), teljesen meggátolta a *L. edodes* MnP-termelését, annak ellenére, hogy a micélium növekedését nem befolyásolta (Buswell és mtsai 1995). Kísérleteinkben hasonló gátlást tapasztaltunk magas Mn-koncentráció (200 μM) esetén, és 2 μM Mn bizonyult optimálisnak. A *T. versicolor* festéklebontása különböző Mn-koncentrációk (3 és 200 μM) mellett nem különbözött (Swamy és Ramsay 1999b). Kísérleteink hasonló eredménnyel jártak az Orange II és az RBBR esetében; a Poly R-478 lebontását jellemző $OD_{520/350}$ arányok alapján ennél a festéknél 20 μM Mn volt a legkedvezőbb.

A polimer festékek, mint pl. a Poly R-478 lebontása és a MnP-termelés között korreláció áll fenn (Gold és mtsai 1988). Ezt az összefüggést támasztják alá azon eredményeink, miszerint a két folyamat optimális feltételei hasonlóak voltak (pl. alacsony N-koncentráció, természetes eredetű tápanyagok jelenléte a táptalajban), illetve a Mn-t nem tartalmazó táptalajon a Poly R-478 lebontása nem ment végbe. Hozzá kell tenni, hogy ez a párhuzam nem minden esetben érvényes, pl. 5-8 mM malátaextraktum-N mellett viszonylag magas MnP-aktivitást mértünk (3/11. ábra), intenzív festékbontás viszont nem volt tapasztalható (3/2. táblázat). Korábbi megfigyelésekkel (Couto és mtsai 2000) összhangban ezek az eredmények arra utalnak, hogy a Poly R-478 lebontásáért elsősorban a MnP felelős, de valószínűleg más enzimek is szerepet játszanak a folyamatban (Swamy és Ramsay 1999b). A WRF csoportba tartozó fajok Poly R-478- és PAH- lebontási képessége között szintén korreláció tapasztalható (Field és mtsai 1992). Ha feltételezzük, hogy a MnP a festéklebontás fő enzime, akkor valószínűleg hasonlóan fontos szerep tulajdonítható neki a PAH-lebontásban is. Mivel a *L. edodes* esetében mind a MnP-termelés, mind a festéklebontás szempontjából az

alacsony N-koncentráció (1-3 mM) bizonyult optimálisnak, feltételezhető, hogy a törzs biodegradációs kapacitása is ilyen feltételek mellett maximális.

Az Orange II lebontásának tápanyagigényével kapcsolatos eredmények igen hasonlóak voltak a Poly R-478 festéknél tapasztaltakhoz, ez alapján arra lehet következtetni, hogy lebontási útvonala hasonló, melyben a MnP részt vesz.

Ahogy a másik két festéknél, az alacsony N-koncentráció és a természetes eredetű tápanyagok hozzáadása a RBBR lebontása szempontjából is kedvező volt, azonban a magas N-koncentráció (8-10 mM) nem gátolta teljes mértékben a lebontást, mely Mn hiányában is végbement. Bár a RBBR lebontásában főleg peroxidáz enzimek vesznek részt (Ollikka és mtsai 1993), ezek az eredmények arra utalnak, hogy az általunk használt kísérleti rendszerekben egyéb enzim(ek) (pl. Lcc) is képes(ek) az elszíntelenedésért felelős lépésre. Ez a folyamat nem feltétlenül közvetlen oxidáció, hanem a bevezető részben említett mechnizmus alapján kis molekulatömegű mediátor molekulák útján is megvalósulhat (Wong és Yu 1999).

A természetes eredetű tápanyagok hozzáadása serkentette a *L. edodes* MnP-termelését, és nem befolyásolt a Lcc-termelést. A tölgyfaforgács mindhárom vizsgált festék lebontására pozitív hatással volt. Ezen eredmények azt mutatják, hogy az *ex situ* bioremediációs technológiák során a lignocellulóz komponenseket tartalmazó mezőgazdasági melléktermékek hozzákeverése pl. a kőolajjal szennyezett földhöz hasznos lehet a WRF törzsek degradációs kapacitásának növelésében.

A 2.3.2. pontban leírtak szerint a malátaextraktumot (15 g/l), keményítőt (3 g/l) és tölgyfaforgácsot (20 g/l) tartalmazó táptalaj bizonyult legkedvezőbbnek a micélium növekedése szempontjából. Az extracelluláris enzimek termelése és a festéklebontás szempontjából ugyanezek a komponensek voltak optimálisak, ám eltérő koncentrációban. A növekedés és az enzimatikus folyamatok szempontjából optimális tápanyagösszetétel tehát egy adott faj esetében is különbözőnek bizonyult, a különböző fajok igényei között pedig még nagyobb eltérések vannak. Ezt érdemes figyelembe venni a WRF csoportba tartozó fajok biotechnológiai alkalmazásai során; a feltételeket optimalizálni kell minden egyes törzs esetén, a felhasználás célja szerint (nagy mennyiségű micélium termelése, enzimtermelés vagy biodegradáció).

3.4.4. Nehézfémek hatása az enzimtermelésre

3.4.4.1. Eredmények

A nehézfémek MnP-termelésre és festékbontásra gyakorolt hatásának vizsgálatához minden nehézfémsóból egyenként olyan koncentrációt állítottunk be a táptalajban, mely mellett a növekedés 80% volt a kontrollhoz képest a 2.3.3. pontban leírt kísérlet eredményei szerint. Az eredményeket a 3/7. táblázat foglalja össze.

Minden nehézfém nagyobb mértékben gátolta a vizsgált enzimatikus folyamatokat, mint a növekedést. A Co és a Mn teljesen meggátolta a MnP-termelést és a festéklebontást az alkalmazott koncentrációban.

Az *in vitro* MnP-aktivitás viszonylag érzékenynek bizonyult a Cd és a Fe jelenlétére, 0.23 mM Cd és 0.13 mM Fe 50%-os gátlást okozott. A többi nehézfém 3 mM koncentrációig nem gátolta az *in vitro* enzimakivitást, sőt, a Mn és a Hg esetében 20 mM, a legmagasabb vizsgált koncentráció sem volt mérhető hatással az aktivitásra.

3/7. táblázat. Poly R-478 lebontása és MnP-termelés különböző nehéz-fémeket tartalmazó táptalajokon.

Nehézfém	Koncentráció (mM)	Lebontási zóna (mm)	MnP (U/l)
-	-	72 (100)[Y]	158 (100)[Y]
Cd	0.0031	37 (26)	41 (26)
Co	0.30	0 (0)	0 (0)
Cu	0.78	40 (31)	41 (26)
Fe	1.2	20 (8)	51 (32)
Hg	0.0085	28 (15)	50 (32)
Mn	2.4	0 (0)	0 (0)
Ni	0.16	41 (32)	40 (25)
Pb	0.89	53 (54)	108 (68)
Zn	0.26	48 (44)	67 (43)

[Y]A zárójelben feltüntetett számok a lebontás és a MnP-termelés kontrollhoz viszonyított %-os mértékét jelzik.

3.4.4.2. Az eredmények értékelése

Az enzimtermelésre gyakorolt hatással kapcsolatos kísérlet során alkalmazott koncentrációban a nehézfémek nem befolyásolták az *in vitro* MnP-aktivitást, tehát a lecsökkent aktivitási értékek csak a hatásukra bekövetkező csökkent szintű enzimtermelésnek tulajdoníthatók. A Fe és a Hg kivételével a festékbontás és a MnP-termelés kontrollhoz viszonyított %-os értékei hasonlóak voltak (3/7. táblázat), ami a 3.4.3.2. pontban leírtakhoz hasonlóan arra utal, hogy a MnP részt vesz a Poly R-478 festék lebontásában (Couto és mtsai 2000). Mivel a Poly R-478 lebontása korrelációban áll mind a MnP-termeléssel (Gold és mtsai 1988), mind a PAH-lebontással (Field és mtsai 1992), utóbbit a nehézfémek valószínűleg hasonlóképpen gátolják, mint a másik két folyamatot. A növekedéshez hasonlóan a *L. edodes* Poly R-478-lebontása kevésbé volt érzékeny a Zn és a Cu jelenlétére, mint a *P. chrysosporium* és a *T. versicolor* festéklebontása (Pointing és mtsai 2000).

Mivel a veszélyes hulladékok általában sokféle környezetszennyező anyag keverékei, és gyakran szennyezettek nehézfémekkel is, "rezisztens" törzsek szelekciója a bioremediációs technológiákhoz alapvető jelentőségű. Kísérleteink eredményei alátámasztják a *L. edodes* micélium alkalmazhatóságát olyan technológiák során, melyeknél a ligninolitikus enzimrendszer hatékony termelésére és működésére nehézfémek jelenlétében van szükség.

4. Összefoglalás

Kísérleteink során a *Lentinus edodes* micélium növekedését, valamint extracelluláris enzimrendszerének működését vizsgáltuk különböző összetételű táptalajokon azzal a céllal, hogy megállapítsuk az összetevők pozitív vagy negatív hatásait, és ezáltal egyrészt az adott fiziológiai folyamat szempontjából optimális táptalaj-összetételt határozzunk meg, másrészt megismerjük ezen folyamatok alakulását a biotechnológiai alkalmazások során fellépő lehetséges gátlóhatások mellett. Az eredményeket a 4/1. táblázat foglalja össze.

Legfontosabb eredményeink értékelése és lehetséges alkalmazási területei a következők:

♦ Meghatároztunk egy, a növekedés szempontjából igen kedvező táptalaj-összetételt, illetve vizsgáltuk különböző szervetlen ionok és nehézfémek növekedésgátló hatását. Ezeknek az eredményeknek a micélium nagy mennyiségben történő előállítása céljából kidolgozott technológiák hatékonyságának növelése szempontjából van jelentősége. A gyors növekedést biztosító tápanyagok (keményítő, malátaextraktum, tölgyfaforgács) jellege bizonyítja a különböző mezőgazdasági és élelmiszeripari melléktermékek felhasználhatóságát gomba-micélium előállítására.

♦ A micélium növekedéséhez hasonló módon meghatároztuk az extracelluláris enzimtermelés és annak degradációs működése szempontjából optimális táptalajösszetételt is. Az erre vonatkozó eredmények közül a legfontosabb, hogy viszonylag alacsony nitrogén-koncentráció (<5 mM) bizonyult kedvezőnek minden vizsgált enzimatikus folyamat szempontjából. Ezek az eredmények hozzájárulnak a lehetséges bioremediációs alkalmazások, valamint az enzimek előállítása során legnagyobb hatékonyságot biztosító körülmények meghatározásához.

♦ A sörgyártás maláta melléktermék kiváló szubsztrátnak bizonyult mind a micélium növekedése, mind az extracelluláris enzimtermelés szempontjából. Ez alapján olcsó, élelmiszeripari melléktermékén alapuló technológia dolgozható ki a micélium és az extracelluláris enzimek nagy mennyiségben történő előállítására.

♦ Bizonyítottuk a *Trichoderma* metabolitok enzimtermelésre gyakorolt indukciós és gátlóhatását. Ezeknek az eredményeknek a két faj között létrejövő, a Shiitake gomba termesztése során komoly problémát okozó antagonizmus, valamint különböző biotechnológiai eljárások alapját képező hatások mechanizmusának megértése szempontjából lehet jelentősége.

4/1. táblázat. A kísérletek során tapasztalt hatások összefoglalása.

	Növekedés	Enzimatikus folyamatok
Szervetlen ionok	Minden vizsgált ion koncentráció-függő növekedésgátló hatást okozott. A legerősebb hatás a nitrit esetében volt tapasztalható; ez a negatív hatás mérsékelhető volt aszkorbinsav vagy teaextraktum hozzáadásával, ami a nitrit mutagén hatásával kapcsolatos hatásmechanizmusra utal.	-
Különböző szén- és nitrogén-források	A micélium növekedése szempontjá-ból a keményítőt (3 g/l), maláta-extraktumot (15 g/l) és tölgyfaforgá-csot (20 g/l) tartalmazó táptalaj bizo-nyult optimálisnak.	Az enzimtermelés szempontjából a keményítőt (10 g/l), malátaextrak-tumot (3.5 g/l) és tölgyfaforgácsot (20 g/l) tartalmazó táptalaj bizonyult optimálisnak. Mind az enzimtermelés, mind a festékanyagok segítségével modellezett biodegradációs tevékeny-ség szempontjából az alacsony N-koncentráció (<5 mM) volt kedvező, a N-forrás és a festékanyag minőségé-től függetlenül. A természetes erdetű adalékok (tölgyfaforgács, szalma) pozitív hatással voltak az enzimatikus folyamatokra.
Sörgyártás maláta melléktermék	A sörgyártás során keletkező maláta melléktermék táptalajként használva a micélium gyors növekedése és nagymértékű enzimtermelés volt mérhető.	
***Trichoderma* metabolitok**	A *Trichoderma* metabolitok a növe-kedést nem befolyásolták.	A *Trichoderma* metabolitok indukál-ták a Lcc-termelést, viszont a MnP-termelést jelentősen csökkentették.
Nehézfémek	Minden vizsgált nehézfémsó kon-centrációfüggő növekedésgátló hatást okozott. A Cd és a Hg esetében kie-melkedően erős gátlóhatás volt ta-pasztalható.	Minden nehézfém nagyobb mérték-ben gátolta a MnP-termelést és a Poly R-478 festék lebontását, mint a növekedést.

♦ A *L. edodes* micélium képes volt mindhárom, a biodegradációs kapacitás modellvegyületeként használt festékanyag enzimatikus lebontására. A növekedés, az enzimtermelés és a festékek bontása által modellezett degradációs aktivitás toleránsnak bizonyult bizonyos nehézfémek viszonylag magas koncentrációjával szemben. Ezek az eredmények alátámasztják a *L. edodes* alkalmazhatóságát különféle bioremediációs célokra.

5. Rövidítések jegyzéke

ABTS	2,2’azino-bis(3-etilbenztiazolin)-6-szulfonát
Lcc	lakkáz enzim
LiP	1ignin-peroxidáz enzim
MnP	mangán-peroxidáz enzim
PAH	poliaromás szénhidrogének
PEG	polietilén-glikol 20 000
RBBR	Remazol Brilliant Blue R festék
WRF	white rot fungi

6. Irodalomjegyzék

Agosin, E., Monties, B., Odier, E. Structural changes in wheat straw components during decay by lignin-degrading white rot fungi in relation to improvement of digestibility for ruminants. *J. Sci. Food Agric.* 1985, 36:925-935.

Archibald, F.S., Paice, M.G., Jurasek, L. Decolorization of kraft bleachery effluent chromophores by *Coriolus* (*Trametes*) *versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 1990, 12:846-853.

Badham, E.R. Growth and competition between *Lentinus edodes* and *Trichoderma harzianum* on sawdust substrates. *Mycologia* 1991, 83:455-463.

Baldrian, P., der Wiesche, C.I., Gabriel, J., Nerud, F., Zadrazil, F. Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66:2471-2478.

Baldrian, P., Gabriel, J. Effect of heavy metals on the growth of selected wood-rotting basidiomycetes. *Folia Microbiol.* 1997, 42:521-523.

Baldrian, P., Gabriel, J., Nerud, F. Effect of cadmium on the ligninolytic activity of *Stereum hirsutum* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia Microbiol.* 1996, 41:363-367.

Barr, D.P., Aust, S.D. Mechanism white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 28:78-87.

Beguin, P., Aubert, J.P. (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 1994, 13:25-58.

Benítez, T., Delgado-Jarana, J., Rincón, A., Rey, M., Limón, C. Biofungicides: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. *Rec. Res. Dev. Microbiol.* 1998, 2:129-150.

Berovic, M., Ostroversnik, H. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid-state bioprocessing of apple pomace. *J. Biotechnol.* 1997, 53:47-53.

Bhatt, M., Patel, M., Rawal, B., Novotny, C., Molitoris, H.P., Sasek, V. Biological decolorization of the synthetic dye RBBR in contaminated soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2000, 16:195-198.

Boyle, D. Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other white-rot fungi in wood. *Soil Biol. Biochem.* 1998, 30:817-823.

Bressa, G., Cima, L., Costa, P. Bioaccumulation of Hg in the mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1988, 16:85-89.

Bruce, A., Austin, W.J., King, B. Control of growth of *Lentinus lepideus* by volatiles from *Trichoderm*a. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 1984, 82:423-428.

Bruce, A., King, B. Biological control of wood decay by *Lentinus lepideus* (Fr.) produced by *Scytalidium* and *Trichoderma* residues. *Mater. Organismen* 1983, 18:171-182.

Bumpus, J.A., Tien, M., Wright, D., Aust, S.D. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 1985, 228:1434-1435.

Buswell, J.A., Cai, Y.J., Chang, S.T. Effect of nutrient N and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula* (*Lentinus*) *edodes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995, 128:81-88.

Buswell, J.A., Mollet, B., Odier, E. Ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* under conditions of N sufficiency. *FEMS Microbiol. Lett.* 1984, 25:295-299.

Buswell, J.A., Odier, E. Lignin biodegradation. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 1987, 6:1-60.

Chen, X., Romaine, C.P., Ospina-Giraldo, M.D., Royse, D.J. A polymerase chain reaction-based test for the identification of *Trichoderma harzianum* biotypes 2 and 4, responsible for the worldwide green mold epidemic in cultivated *Agaricus bisporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 52:246-250.

Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T., Fukuoka, F. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) sing. *Nature* 1969, 222:687-688.

Cihangir, N., Saglam, N. Removal of cadmium by *Pleurotus sajor-caju* basidiomycetes. *Acta Biotechnol.* 1999, 19:171-177.

Considine, P.J., Buckley, R.J., Griffin, T.O., Touhy, M.G., Coughlan, M.P. A simple and inexpensive method of solid state cultivation. *Biotechnol. Tech.* 1989, 3:85-90.

Couto, S.R., Rivela, I., Sanroman, A. In vivo decolourization of the polymeric dye Poly R-478 by corncob cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Acta Biotechnol.* 2000, 20:31-38.

D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V., Di Mattia, E., Giovannozzi-Sermanni, G. Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process Biochem.* 1999, 34:697-706.

D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V., Giovannozzi-Sermanni, G. Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *J. Biotechnol.* 2000, 77:265-273.

Dhawale, S.S., Lane, A.C., Dhawale, S.W. Effects of mercury on the white rot fungus *Phanerochaete chrysosproium*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1996, 56:825-832.

Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.-E. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62:1151-1158.

El-Zalaki, M.E., Hamza, M.A. Edible mushrooms as producers of amylases. *Food Chem.* 1979, 4:203-211.

Faison, B.D., Kirk, T.K. Factors involved in the regulation of ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985, 49:299-304.

Fakoussa, R.M., Hofrichter, M. Biotechnology and microbiology of coal degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 52:25-40.

Favero, N., Bressa, G., Costa, P. Response of *Pleurotus ostreatus* to cadmium exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1990, 20:1-6.

Fenn, P., Kirk, T.K. Relationship of N to the onset and suppression of ligninolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 1981, 130:59-65.

Field, J.A., De Jong, E., Costa, G.F., De Bont, J.A.M. Biodegradtion of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white-rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, 58:2219-2226.

Fu, S.Y., Yu, H.S., Buswell, J.A. Effect of nutrient N and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Pleurotus sajor-caju*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, 147:133-137.

Fujihara, S., Kasuga, A., Sugahara, T., Hashimoto, K., Kiyomizu, Y., Nakazawa, T., Aoyagi, Y. Nitrogen content of Shiitake mushroom [*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.] cultivated on sawdust medium and dependence on that in the medium. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* 2000, 47:191-196.

Gabriel, J., Kofronova, O., Rychlovsky, P., Krenzelok, M. Accumulation and effect of cadmium in the wood-rotting basidiomycete *Daedalea quercina*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1996, 57:383-390.

Gawande, P.V., Kamat, M.Y. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. *J. Appl. Microbiol.* 1999, 87:511-519.

Glenn, J.K., Akileswaran, L., Gold, M.H. Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986, 251:688-696.

Glenn, J.K., Gold, M.H. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium. Arch. Biochem. Biophys.* 1985, 242:329-341.

Gold, M.H., Glenn, J.K., Allic, M. Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. *Methods Enzymol.* 1988, 161:74-78.

Grabski, A.C., Grimek, H.J., Burgess, R.R. Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* and its biocatalytic generation of Mn(III)-chelate as a chemical oxidant of chlorophenols. *Biotechnol. Bioeng.* 1998, 60:204-215.

Grabski, A.C., Rasmussen, J.K., Coleman, P.L., Burgess, R.R. Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* on alkylaminated Emphaze AB 1 polymer for generation of Mn^{3+} as an oxidizing agent. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1996, 60:1-17.

Hatvani, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 2001, 17:71-74.

Hibino, Y., Konishi, Y., Koike, J., Tabata, T., Ohashi, Y., Sugano, N. Productions of interferon-γ and nitrite are induced in mouse splenic cells by a heteroglycan-protein fraction from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Immunopharmacology* 1994, 28:77-85.

Jeffries, T.W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation* 1990, 1:163-176.

Jong, S.C., Birmingham, J.M. Medicinal and therapeutic value of the Shiitake mushroom. *Adv. Appl. Microbiol.* 1993, 39:153-184.

Kaal, E.E.J., de Jong, E., Field, J.A. Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by N nutrients in the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59:4031-4036.

Kaal, E.E.J., Field, J.A., Joyce, T.W. Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by N-sufficient media. *Bioresource Technol.* 1995, 53:133-139.

Kapdan, I.K., Kargia, F., McMullan, G., Marchant, R. Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by *C. versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 2000, 26:381-387.

Kelley, R.L., Reddy, C.A. Identification of glucose oxidase activity as the primary source of hydrogen peroxide in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium. Arch. Microbiol.* 1986, 144:248-253.

Keyser, P., Kirk, T.K., Zeikus, J.G. Ligninolytic enzyme systems of *Phanerochaete chrysosporium*, synthesized in the absence of lignin in response to N starvation. *J. Bacteriol.* 1978, 135:790-797.

Kirk, T.K., Farrell, R.L. Enzymatic "combustion", the microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 1987, 41:465-505.

Kirk, T.K., Shimada, M. Lignin biodegradation: the microorganisms involved and the physiology and biochemistry of degradation by white-rot fungi. Biosynthesis and biodegradation of wood components (ed. Higuchi, T.) Academic Press, Orlando, 1985, pp. 579-605.

Knapp, J.S., Newby, P.S., Reece, L.P. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 1995, 17:664-668.

Leatham, G.F. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of a lignocellulosic medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985, 50:859-867.

Leatham, G.F., Kirk, T.K. Regulation of ligninolytic activity by nutrient N in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 1983, 16:65-67.

Leifa, F., Pandey, A., Soccol, C.R. Solid-state cultivation - an efficient method to use toxic agro-industrial residues. *J. Basic Microbiol.* 2000, 40:187-197.

Lelik, L., Vitányi, G., Lefler, J., Hegoczky, J., Nagy-Gasztonyi, M., Vereczkey, G. Production of the mycelium of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom and investigation of its bioactive compounds. *Acta Aliment. Hung.* 1997, 26:271-277.

Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.-S., Hofrichter, M., Rogalski, J. Biodegradtion of lignin by white-rot fungi. *Fungal Genet. Biol.* 1999, 27:175-185.

Licht, W.R., Tannenbaum, S.R., Deen, W.M. Use of ascorbic acid to inhibit nitrosation: kinetic and mass transfer considerations for an in vitro system. *Carcinogenesis* 1988, 9:365-372.

Luca, D., Luca, V., Cotor, F., Raileanu, L. In vivo and in vitro cytogenetic damage induced by sodium nitrite. *Mutat. Res.* 1987, 189:333-339.

Mahmoud, S.A., Abdel-Hafez, A.M., Mashhoor, W.A., Refaat, A.A. Utilization of industrial and agricultural by-products for fungal amylase production. *Zbl. Bakter. [Naturwiss]* 1978, 133:115-120.

Mandal, T.K., Baldrian, P., Gabriel, J., Nerud, F., Zadrazil, F. Effect of mercury on the growth of wood-rotting basidiomycetes *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus* and *Serpula lacrymans*. *Chemosphere* 1998, 36:435-440.

Mann, H.B., Whitney, D.R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Statist.* 1947, 18:50-60.

Melgar, M.J., Alonso, J., Perez-Lopez, M., Garcia, M.A. Influence of some factors in toxicity and accumulation of cadmium from edible wild macrofungi in NW Spain. *J. Environ. Sci. Health B* 1998, 33:439-455.

Meulenberg, R., Rijnaarts, H.H.M., Doddema, H.J., Field, J.A. Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, 152:45-49.

Michel, F.C.J., Dass, S.B., Grulke, E.A., Reddy, C.A. Role of manganese peroxidases (MNP) and lignin peroxidases (LIP) of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991, 57:2368-2375.

Mizuno, T. Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi. *Food Rev. Int.* 1995, 11:7-21.

Moo-Young, M., Moreira, A.R., Tengerdy, R.P. Principles of solid state fermentation. The Filamentous Fungi, vol. 4 (ed. Smith, J.E., Berry, D.R., Kristiansen, B.) Edward Arnold, London, 1983, pp. 117-144.

Nakajima, A., Sakaguchi, T. Accumulation of uranium by basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993, 38:574-578.

Odds, F.C. Sabouraud('s) agar. *J. Med. Vet. Mycol.* 1991, 29:355-359.

Ollikka, P., Alhonmäki, K., Leppären, V.-M., Glumoff, T., Raijola, T., Suominen, L. Decolorisation of azo, triphenylmethane, heterocyclic and polycyclic dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59:4010-4016.

O'Malley, D.M., Whetten, R., Bao, W., Chen, C.L., Sederoff, R.R. The role of laccase in lignification. *Plant J.* 1993, 4:751-757.

Ospina-Giraldo, M.D., Royse, D.J., Chen, X., Romaine, C.P. Molecular phylogenetic analyses of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushroom green mold. *Phytopathology* 1999, 89:308-313.

Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., Vandenberge, L.P.S., Mohan, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues II: cassava bagasse. *Bioresource Technol.* 2000, 74:81-87.

Papavizas, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1985, 23:23-54.

Pariza, M.W., Foster, E.M. Determining the safety of enzymes used in food processing. *J. Food Prot.* 1983, 46:453-458.

Pointing, S.B. Exploiting the versatile ligninolytic system of white-rot fungi. Bio-Exploitation of Filamentous Fungi (ed. Pointing, S.B., Hyde, K.D.) Fungal Diversity Research Series 2001, 6:253-290.

Pointing, S.B., Bucher, V.V.C., Vrijmoed, L.L.P. Dye decolorization by sub-tropical basidiomycetous fungi and the effect of metals on decolorizing ability. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2000, 16:199-205.

Purkayastha, R.P., Mitra, A.K., Bhattacharyya, B. Uptake and toxicological effects of some heavy metals on *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1994, 27:7-13.

Richardson, D.J., Watmough, N.J. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Curr. Opin. Chem Biol.* 1999, 3:207-19.

Rodriguez, E., Pickard, M.A., Vazquez-Duhalt, R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Curr. Microbiol.* 1999, 38:27-32.

Routledge, M.N., Mirsky, F.J., Wink, D.A., Keefer, L.K., Dipple, A. Nitrite-induced mutations in a forward mutation assay: influence of nitrite concentration and pH. *Mutat. Res.* 1994, 322:341-346.

Royse, D.J., Schisler, L.C., Diehle, D.A. Shiitake mushrooms. Consumption, production and cultivation. *Interdiscipl. Sci. Rev.* 1985, 10:329-335.

Ruttimann-Johnson, C., Salas, L., Vicuna, R., Kirk, T.K. Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59:1792-1797.

Salmones, D., Mata, G., Ramos, L.M., Waliszewski, K.N. Cultivation of shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, in several lignocellulosic materials originating from the subtropics. *Agronomie* 1999, 19:13-19.

Sanglimsuwan, S., Yoshida, N., Morinaga, T., Murooka, Y. Resistance to and uptake of heavy metals in mushrooms. *J. Ferment. Bioeng.* 1993, 75:112-114.

Sanjust, E., Pompei, R., Rescigno, A., Rinaldi, A., Ballero, M. Olive milling wastewater as a medium for growth of four *Pleurotus* species. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1991, 31:223-235.

Savoie, J.-M., Delpech, P., Billette, C. Inoculum adaptation changes the outcome of the competition between *Lentinula edodes* and *Trichoderma* spp. during shiitake cultivation on pasteurized wheat straw. Science and Cultivation of Edible Fungi (ed. Van Griensven, L.J.L.D.) Balkema, Rotterdam, 2000, pp. 667-674.

Savoie, J.-M., Mata, G. The antagonistic action of *Trichoderma* sp. hyphae to *Lentinula edodes* hyphae changes lignocellulotytic activities during cultivation in wheat straw *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 15:369-373.

Savoie, J.-M., Mata, G., Billette, C. Extracellular laccase production during hyphal interactions between *Trichoderma* sp. and Shiitake, *Lentinula edodes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998, 49:589-593.

Schoeman, M.W., Webber, J.F., Dickinson, D.J. The effect of diffusible metabolites of *Trichoderma harzianum* on *in vitro* interactions between basidiomycete isolates at two different temperature regimes. *Mycol. Res.* 1996, 100:1454-1458.

Shah, M.M., Barr, D.P., Chung, N. and Aust, S.D. Use of white rot fungi in the degradation of environmental chemicals. *Toxicol. Lett.* 1992, 64-65:493-501.

Siegel, S.M., Galun, M., Siegel, B.Z. Filamentous fungi as metal biosorbents: a review. *Water Air Soil Poll.* 1980, 53:335-344.

Soares, M., Christen, P., Pandey, A., Soccol, C.R. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. *Process Biochem.* 2000, 35:857-861.

Spadaro, J.T., Gold, M.H., Renganathan, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, 58:2397-2401.

Stich, H.F. Teas and tea components as inhibitors of carcinogen formation in model systems and man. *Prev. Med.* 1992, 21:377-384.

Stich, H.F., Rosin, M.P., Bryson, L. Inhibition of mutagenicity of a model nitrosation reaction by naturally occurring phenolics, coffee and tea. *Mutat. Res.* 1982, 95:119-128.

Suzuki, F., Suzuki, C., Shimomura, E., Maeda, H., Fujii, T., Ishida, N. Antiviral and interferon-inducing activities of a new peptidomannan, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *J. Antibiot.* 1979, 32:1336-1345.

Swamy, J., Ramsay, J.A. (a) The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 1999, 24:130-137.

Swamy, J. and Ramsay, J.A. (b) Effects of Mn^{2+} and NH_4^+ concentrations on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decoloration by *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 51:391-396.

Takehara, M., Kuida, K., Mori, K. Antiviral activity of virus-like particles from *Lentinus edodes* (Shiitake). *Arch. Virol.* 1979, 59:269-274.

Tanaka, K., Hayatsu, T., Negishi, T., Hayatsu, H. Inhibition of N-nitrosation of secondary amines in vitro by tea extracts and catechins. *Mutat. Res.* 1998, 412:91-98.

Tannenbaum, S.R., Wishnok, J.S., Leaf, C.D. Inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991, 53:247-250.

Tatarko, M., Bumpus, J.A. Biodegradation of Congo Red by *Phanerochaete chrysosporium*. *Water Res.* 1998, 32:1713-1717.

Thurston, C.F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 1994, 140:19-26.

Tien, M., Kirk, T.K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Science* 1983, 221:661-663.

Tokimoto, K., Komatsu, M. Effect of carbon and nitrogen sources in media on the hyphal interference between *Lentinus edodes* and some species of *Trichoderma. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 1979, 45:261-264.

Tomme, P., Warren, R.A., Gilkes, N.R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microbiol. Physiol.* 1995, 37:1-81.

Tuor, U., Wariishi, H., Schoemaker, H.E., Gold, M.H. Oxidation of phenolic arylglycerol β-aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: oxidative cleavage of an α-carbonyl model compound. *Biochemistry* 1992, 31:4986-4995.

Ullah, M.A., Bedford, C.T., Evans, C.S. Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000, 53:230-234.

Wainwright, M. An Introduction to Fungal Biotechnology. Wiley Biotechnology Series (ed. Bryant, J.A., Kennedy, J.F.) John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, 1992, pp. 2-12, 31, 67-69, 140.

Wariishi, H., Valli, K., Gold, M.H. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 1992, 267:23688-23695.

Whong, W.Z., Stewart, J.D., Wang, Y.K., Ong,T. Acid-mediated mutagenicity of tobacco snuff: its possible mechanism. *Mutat. Res.* 1987, 177:241-246.

Wolfenden, B.S., Willson, R.L. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1982, II:805-812.

Wong, Y.X., Yu, J. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Res.* 1999, 33:3512-3520.

Yamamoto, Y., Shirono, H., Kono, K., Ohashi Y. Immunopotentiating activity of the water-soluble lignin rich fraction prepared from LEM-the extract of the solid culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997, 61:1909-1912.

Yetis, U., Dolek, A., Dilek, F.B., Ozcengiz, G. The removal of Pb(II) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Water Res.* 2000, 34:4090-4100.

Zhao, J., de Koker, T.H., Janse, B.J.H. Comparative studies of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases produced by selected white rot fungi in solid media. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996, 145:393-399.

Zheng, Z.X., Shetty, K. (a) Solid-state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. *Process Biochem.* 2000, 35:825-830.

Zheng, Z.X., Shetty, K. (b) Solid-state bioconversion of phenolics from cranberry pomace and role of *Lentinus edodes* β-glucosidase. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48:895-900.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani

szüleimnek, amiért tanulmányaim során mindvégig támogattak, és a matematikai vonatkozású eredményekhez pótolhatatlan segítséget nyújtottak;

témavezetőmnek, Prof. Mécs Imrének, hogy irányította és hasznos tanácsaival elősegítette kutatásaimat, illetve hogy kísérletes munkámat az általa vezetett laboratóriumban lehetővé tette;

Kesserű Péter Ph.D. hallgatónak a lelkesítő támogatásért és a kiváló ötletekért;

Dr. Kredics Lászlónak a közös munkáért, és a SzTE TTK Mikrobiológiai Tanszékének, hogy ehhez a törzseket rendelkezésünkre bocsátotta;

Zsedényi Sárának, Zsurka Ferencnének, Ambrus Erzsébetnek és Szilágyi Lajosnénak, akiknek a mindennapi segítsége nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el;

David Durham-nek a publikációk kéziratának angol nyelvi lektorálásáért;

Prof. Pungor Ernőnek és Prof. Biacs Péternek, a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány volt és jelenlegi főigazgatójának, hogy tanulmányaimhoz ösztöndíjat biztosítottak;

Dr. Kálmán Miklósnak, a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézete igazgatójának, hogy kutatásaimhoz a körülményeket biztosította;

a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézete és a Szegedi Tudományegyetem valamennyi munkatársának, aki munkám sikeréhez bármilyen formájában hozzájárult.

8. Saját közlemények jegyzéke

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

Publikációk

Hatvani, N., Kredics, L., Antal, Z., Mécs, I. Changes in activity of extracellular enzymes in dual cultures of *Lentinula edodes* and mycoparasitic *Trichoderma* strains. *Journal of Applied Microbiology* 2002, 92:415-423.

Hatvani, N., Mécs, I. Production of laccase and manganese peroxidase by *Lentinus edodes* on malt-containing by-product of the brewing process. *Process Biochemistry* 2001, 37:491-496.

Hatvani, N., Mécs, I. Effect of the nutrient composition on dye-decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. *Enzyme and Microbial Technology* 2002, 30:381-386.

Elbírálás alatt levő kéziratok

Hatvani, N., Mécs, I. Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorisation and enzyme activity of *Lentinula edodes*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (elbírálás alatt)

Hatvani, N., Mécs, I. Effects of different inorganic salts and organic nutrient components on the growth of *Lentinula edodes* (Shiitake) mycelium on solid medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (elbírálás alatt)

Poszterek

Kredics, L., **Hatvani, N.**, Mécs, I., Antal, Z., Manczinger, L., Nagy, E. Extracellular enzyme profiles of mycoparasitic *Trichoderma* strains and *Lentinula edodes* during *in vitro*

antagonism. 9th International Symposium on Microbial Ecology: Interactions in the Microbial World, Amszterdam, 2001. augusztus 26-31. (Book of Abstracts pp. 261)

Kredics, L., **Hatvani, N.**, Mécs, I., Antal, Z., Manczinger, L., Nagy, E. Extracelluláris enzimek aktivitásváltozásai *Lentinula edodes* és mikoparazita *Trichoderma* törzsek *in vitro* antagonizmusa során. Az 50 éves Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001. évi Jubileumi Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001. október 10-12.
(Az absztrakt megjelenik "Activity changes of extracellular enzymes during *in vitro* antagonism of *Lentinula edodes* and mycoparasitic *Trichoderma* strains" címen: *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2002, 49.)

Egyéb közlemények

Publikációk

Hatvani, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2001, 17:71-74.

Előadások

Hatvani, N., Kiss, I. Antimicrobial effects of the Shiitake mushroom. Regional Symposium on Medical Biotechnology, Szeged, 1998. március 29-31.

Hatvani, N. Biológiailag aktív anyagok izolálása Shiitake (*Lentinus edodes*) gombából. Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézete, Szakmai Nap, Szeged, 1998. június 29.

Hatvani, N. A Shiitake gomba (*Lentinus edodes*) antimikrobiális hatású anyagai. Doktoranduszok II. Országos Konferenciája, Debrecen, 1998. augusztus 30-szeptember 1.

Poszterek

Hatvani, N., Kiss, I., Sprőber, P., Mécs, I. A Shiitake gomba *(Lentinus edodes*) antimikrobiális hatású anyagai. Magyar Kemoterápiás Társaság XIII. Konferenciája, Debrecen, 1998. június 2-5.

Pásztor, M., Blazsó, G., **Hatvani, N.**, Mécs, I. Az agyödéma kialakulása során fellépő Na, K és Ca ionkoncentráció változása Sendai vírussal fertőzött patkányokban. 8-th Solid Sampling Spectrometry Colloquium and 41-st Hungarian Conference on Spectrochemistry, Budapest, 1998 szeptember 1-4.

Blazsó, G., **Hatvani, N.**, Pásztor, M., Mécs, I. Interferon inducerek hatása az ischaemiás agyödémára patkányban. Magyar Élettani Társaság LXVI. Vándorgyűlése, Szeged, 2001. június 6-8.

9. Summary

In the present study, the growth and the extracellular enzyme production of *Lentinus edodes* were investigated on media with various compositions in order to determine the positive or negative effects of the components, so as to establish the optimum medium for the physiological processes and to understand the course of these processes in response to possible inhibitory effects during applications in biotechnology. The results are summarised in Table 9/1.

The most important results and their possible applications in the field of biotechnology are listed below:

♦ An optimum medium for mycelial growth was determined, and the growth inhibitory effects of certain inorganic ions and heavy metal salts were investigated. The results of these experiments are of great significance in enhancing the effectivity and reducing the costs in the technologies developed for the large-scale cultivation of the mycelium. The fact that starch and malt extract proved ideal for mycelial growth implies that agro-industrial by-products can be applied as growth substrate.

♦ Similarly as for the mycelial growth, medium compositions optimum for the production and degradation activity of extracellular enzymes were also determined. A relatively low nitrogen concentration (<5 mM) proved optimum for all the enzymatic processes investigated. The results of these experiments allowed the establishment of conditions ensuring maximum effectivity during the production of extracellular enzymes and their application in bioremediation.

♦ The malt-containing by-product of the brewing process proved to be a suitable material for mycelial growth and for the production of high levels of extracellular enzymes. The growth of mycelium on this substrate has the potential of significantly reducing the costs of the large-scale production of mycelium and enzymes.

♦ The induction and inhibition of the enzyme production of *L. edodes* by *Trichoderma* metabolites were demonstrated in different systems. These effects could be of great significance as concerns an understanding of the mechanisms involved in the antagonism between the two species, which may give rise to serious problems during mushroom cultivation.

Table 9/1. Summary of the most important results of the study.

	Mycelial growth	Enzymatic processes
Inorganic ions	All of the inorganic salts investigated exerted concentration-dependent inhibitory effects. Nitrite caused the strongest inhibition; this effect could be reduced by the addition of ascorbic acid or a black tea extract. These results support the suggestion that the inhibitory effect could also be caused by the mutagenic activity of nitrite.	-
Different carbon and nitrogen sources	The medium containing starch (3 g/l), malt extract (15 g/l) and oak wood chips (20 g/l) proved best for mycelial growth.	The medium containing starch (10 g/l), malt extract (3.5 g/l) and oak wood chips (20 g/l) proved best for mycelial growth. A relatively low N concentration (<5 mM) was optimum for both enzyme production and biodegradation activity, modelled by the decolorisation of different dyes, regardless of the N source or dye used. The addition of natural supplements (oak sawdust and wheat straw) exerted a positive effect on the enzymatic processes.
Malt-containing by-product of the brewing process	The malt-containing by-product ensured fast mycelial growth and the production of high levels of extracellular enzymes.	
***Trichoderma* metabolites**	These metabolites did not affect the mycelial growth.	The production of Lcc and MnP was increased and decreased, respectively, in the presence of these metabolites.
Heavy metal salts	Each of the heavy metal salts exerted a concentration-dependent inhibitory effect on the growth. The mycelial growth was extremely sensitive to cadmium and mercury ions.	All of the tested heavy metal salts inhibited the decolorisation of the dye Poly R-478 and the production of MnP to a greater extent than they inhibited growth.

♦ *L. edodes* mycelium was able to decolorise all three dyes used as model compounds for the degradation of aromatic xenobiotics. The growth, the enzyme production and the degradation capacity investigated via the decolorisation of the dyes proved to be tolerant to relatively high concentrations of several heavy metal salts. These results indicate that the extracellular enzyme system of *L. edodes* could be applied for different bioremediation technologies.