

# Cellulolyse und Lignolyse in der Biotechnologie

## Erschließung neuer Nahrungsquellen und Entgiftung verseuchter Böden durch Pilze? Von Anne Traulich und Hans-Otto Schwantes

**Einige Pilze (Weißfäuleerreger) aus der Klasse der Basidiomyceten, die seit Jahrhunderten wegen ihrer holzerstörenden Wirkung und dem damit verbundenen wirtschaftlichen Schaden gefürchtet werden, sind in neuerer Zeit für die biotechnologisch orientierte Forschung hochinteressant geworden. Man erhofft sich durch ihre besonderen Stoffwechselfähigkeiten Hilfe bei der Lösung so dringender Probleme, wie sie die Erschließung neuer Nahrungsquellen und die Entseuchung von mit organischen Umweltgiften wie Dioxin, Lindan, DDT u. a. belasteten Böden darstellen.**

Etwa 95% des jährlich photosynthetisch fixierten Kohlenstoffs wird von den pflanzlichen Produzenten in Form der Biopolymere Cellulose und Lignin festgelegt. Der überwiegende Teil der tierischen Konsumenten kann diese Substanzen – oftmals bezeichnet als Lignocellulose – als Nahrungsquelle nicht nutzen.

Die Aufbereitung dieses Potentials obliegt Organismen, die als Destruenten bezeichnet werden. Herausragende Vertreter sind hierbei Pilze, die zur Gruppe der Weißfäuleerreger gehören, weil sie zumeist sowohl über die Fähigkeit zum fermentativen Abbau der Cellulose (Cellulolyse) als auch zur Biodegradation des Ligninpolymers (Lignolyse) verfügen.

Gegenüber dem enzymatischen Abbau des Ligninpolymers ist die Cellulolyse begünstigt durch den hoch geordneten Aufbau der Cellulose aus einheitlichen, gleichförmig verknüpften Grundbausteinen ( $\beta$ -1,4-glykosidisch verknüpften Glucosemolekülen). Die Fähigkeiten der Weißfäuleerreger, lignocellulosehaltige Restrohstoffe (z. B. Abfälle aus der Land- und Forstwirtschaft) als Kultursubstrat zu nutzen, führt zu einer Anreicherung des bewachsenen Substrats vornehmlich mit pilzlichem Protein, Vitaminen, Mono- und Disacchariden, die mit dem Begriff der biologischen Substrataufwertung beschrieben wird. Das Interesse an der biotechnologischen Nutzung der Weißfäuleerreger konzentriert sich neben den Prozessen, die zum Phänomen der biologischen Substrataufwertung führen, vornehmlich auf die Fähigkeit zur Lignolyse.

Die Lignolyse, zu der in eingeschränkter Form einige Bakterien und ausgeprägt nur die o. a. pilzlichen Organismen befähigt sind, muß an einem hochpolymeren Riesemolekül angreifen, das je nach Pflanzen-

gruppe aus verschiedenen variierenden Unterheiten mit stark wechselndem Verknüpfungsmuster aufgebaut ist.

Obwohl die Fähigkeit zum Ligninabbau bei der Gruppe der holzerstörenden Pilze schon seit mehr als 100 Jahren als Einteilungskriterium für das Schadbild genutzt wird, ist erst in jüngster Zeit die Aufklärung des hierfür zugrunde liegenden enzymatischen Prozesses gelungen. Die Fähigkeit zur Lignolyse, vor 100 Jahren rein phänomenologisch durch die Verfärbung des abgebauten Holzes beschrieben, hat zu der bis heute gültigen Einteilung pilzlicher Holzersetzer geführt in Weißfäuleerreger (Cellulose und Ligninabbau) und Rot- oder Braunfäuleerreger, die ihren Abbau im wesentlichen auf den Kohlenhydratanteil des Holzes beschränken.

Der Aufbau des Lignins aus definierten, aber variierenden Unterheiten erfolgt offensichtlich nach dem Zufallsprinzip und führt zu einem Riesenspolymer, das in seiner Ausdehnung prinzipiell nur durch die Größe der Pflanze selbst begrenzt ist. Als zusätzliches Hemmnis für die Erforschung des Ligninabbaus erwies sich die inzwischen bekannte Tatsache, daß die Lignolyse als Prozeß des Sekundärmetabolismus zeitlich nicht korreliert ist mit den eigentlichen Wachstumsprozessen – dem Primärmetabolismus – der Weißfäuleerreger. 1928 wurde zur Unterscheidung von Weißfäuleerregern und Braunfäuleerregern der erste Biotest auf ligninähnlichen Modellsubstanzen entwickelt. Seit 1938 kennt man die zentrale Bedeutung von Phenoloxidasen und verwandten Enzymen für die Auslösung dieser Testreaktionen. Aber bis 1983 war unklar, ob der primäre Angriff auf das Ligninmolekül ein tatsächlich enzymatischer ist oder ein enzym-initiiertes Angriff niedermolekularer Sauerstoffradikale. Das in jüngster Zeit für den Ligninabbau beschriebene Enzym, die Ligninase, zeigt biochemisch verblüffende Eigenschaften. Sie spaltet durch Elektronenentzug C-C-Bindungen und zerlegt Lignin in entsprechende Radikale, die letztlich weitgehend zu CO<sub>2</sub> und Wasser abgebaut werden. Diese erstaunliche Potenz der Ligninase, die aufgrund ihres äußerst variablen Angriffsziels notgedrungen von geringer Substratspezifität sein muß, befähigt nach neuesten Erkenntnissen auch zum biologischen Abbau von organischen Umweltgiften wie Dioxin, DDT, Lindan u. a. organischen Verbindungen.

Mögliche biotechnologische Anwendungen des lignocellulolytischen Potentials der Weißfäuleerreger zur Aufarbeitung von Restrohstoffen zu proteinreichen Tierfuttern, zur Herstellung von Cellulosen und zur Produktion von Zuckern, Äthanol und Biogas werden international intensiv erforscht.

Auch im Institut für Pflanzenökologie der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Abteilung Ökologie der Mikroorganismen wurden im Rahmen einer Dissertation vergleichende Untersuchungen zu repräsentativen Stoffwechselleistungen ausgewählter pilzlicher Holzersetzer durchgeführt. Die Fragestellung bei diesen Arbeiten konzentrierte sich im besonderen Maße auf die Einflußnahme der Hauptnährstoffe Kohlenstoff und Stickstoff auf pilzliche Stoffwechselleistungen.

Die lignocellulolytischen Aktivitäten der Weißfäuleerreger sind Ausschnitte aus einem äußerst komplexen Gesamtstoffwechsel. Eine Grobeinteilung unterscheidet zwischen Primärmetabolismus, der vornehmlich gekennzeichnet ist durch eine starke Zunahme der pilzlichen Biomasse und die physiologische Ausprägung der vegetativen Entwicklungsphase des Pilzes, und dem Sekundärmetabolismus, der in der Regel die reproduktive Phase des Organismus einleitet, bei den hier untersuchten Pilzen aber u. a. Stoffwechselprozesse der Lignolyse einschließt. Stoffwechselumstimmung bis hin zur Umschaltung vom Primär- zum Sekundärmetabolismus werden maßgeblich mitbestimmt vom Nährstoffangebot.

Diese heterotrophe Ernährungsweise der Pilze erklärt die starke Abhängigkeit pilzlicher Stoffwechselleistungen vom Substratangebot. Die Ansprüche pilzlicher Organismen beinhalten Spurenelemente und Vitamine, aber diese werden mengenmäßig klar dominiert vom Bedarf an physiologisch verwertbaren Kohlenstoff- und Stickstoffquellen. Der vergleichsweise hohe Stickstoffbedarf pilzlicher Organismen erklärt sich nicht nur aus der für alle Lebewesen typischen Stickstoffanforderung zur Nukleinsäuresynthese und Proteinproduktion, sondern wird nicht unwesentlich bestimmt durch den Stickstoffanteil beim pilzlichen Zellwandaufbau. Die Variation dieser beiden Hauptnährstoffquellen eröffnet Möglichkeiten zur selektiven Beeinflussung pilzlicher Stoffwechselleistungen. Im Hinblick auf die biologische Substrataufwer-

tung heißt dies im besonderen: Förderung pilzlicher Wachstumsleistungen und damit verbunden vermehrte Protein- und Zuckerkakkumulation im Pilz-Substrat-Komplex ermöglicht durch stimulierte cellulolytische Aktivität.

Nicht nur die Prozesse des pilzlichen Primärmetabolismus, die zur biologischen Substrataufwertung führen, unterliegen der starken Einflußnahme von Kohlenstoff- und Stickstoffquellen im Substrat, sondern auch Prozesse des Sekundärmetabolismus, wie die Lignolyse, sind komplex reguliert über das Angebot der beiden Hauptnährstoffquellen.

Die bis heute gebräuchliche Definition pilzlicher Substrate über das C/N-Verhältnis kann die komplexen wechselseitigen Ab-

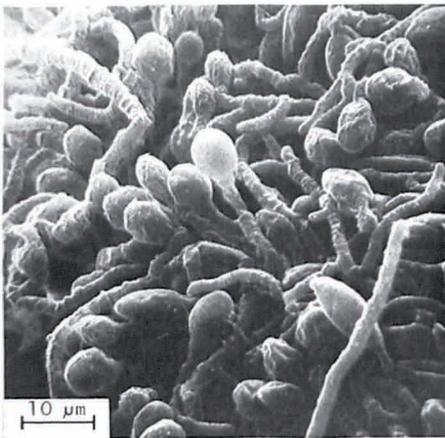


Abb. 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Sporotrichum pulverulentum*. Pilzmyzel mit Sporen.

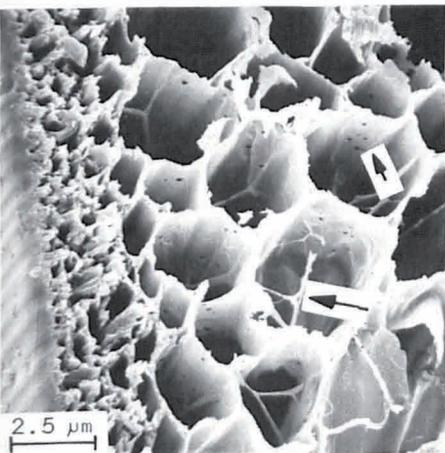


Abb. 2: Durch Weißfäule verursachte Bohrlöcher: typische Erscheinungsform der lignocellulolytischen Aktivität der Weißfäuleerreger. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Haferstroh nach zweiwöchigem Bewuchs mit *Sporotrichum pulverulentum* → = Bohrlöcher, → = Hyphen (Pilzmyzel).

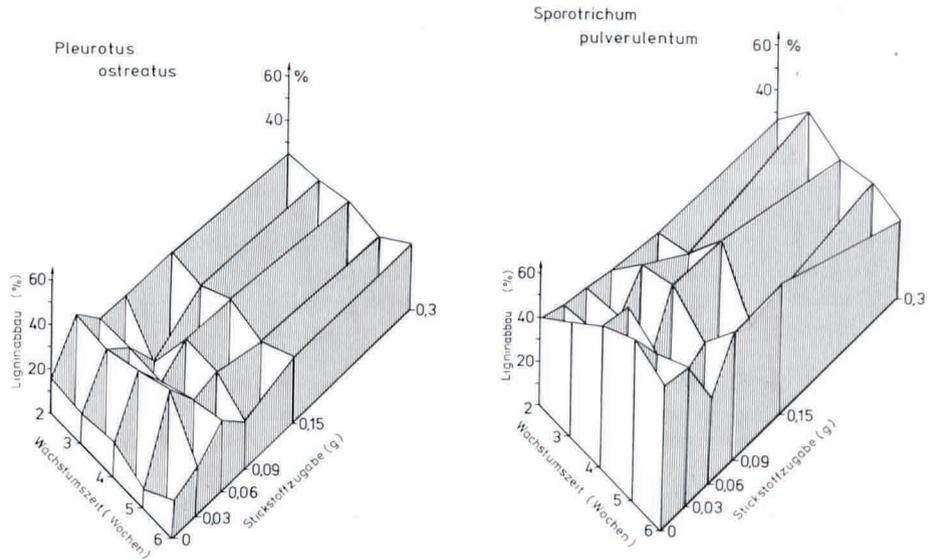


Abb. 3 a, b: Ligninabbau durch *Sporotrichum pulverulentum* und *Pleurotus ostreatus* in Abhängigkeit von der Wachstumszeit und Stickstoffanreicherung des Grundsubstrates (Haferstroh).

hängigkeiten jedoch nur recht unvollkommen beschreiben:

- Die absolute Konzentration der angebotenen C-Quelle nimmt entscheidenden Einfluß auf die Stimulierbarkeit pilzlicher Wachstumsleistungen durch Stickstoff (C-Quelle reguliert N-Effekt). Darüber hinaus ist diese Anregung zur pilzlichen Biomasseproduktion abhängig von der physiologischen Verwertbarkeit der angebotenen N-Quelle, wobei die Diskriminierung zwischen den Stickstoffverbindungen Ammonium und Nitrat nur einen Teilaspekt darstellt.

- Die wechselseitige Beeinflussung von Kohlenstoffquelle und Stickstoffbedarf für Prozesse des pilzlichen Primärmetabolismus wird deutlich beim Einsatz komplexer C-Quellen als Glucose, wie Cellulosepulver und Carboxymethylcellulose. Die extrazellulären Prozesse der Cellulolyse, die eine massive Ausschüttung von Cellulasen erfordern, führen zu einem signifikant höheren Stickstoffbedarf pilzlicher Organismen beim Wachstum auf cellulosehaltigen Substraten. Neben der Stimulierung pilzlicher Biomasseproduktion durch Stickstoffdüngung läßt sich hierbei durch ein wachstumsbegrenzendes Stickstoffangebot die cellulolytische Aktivität der Weißfäuleerreger nutzen zur Anreicherung von Cellulose-spaltprodukten in Form von leicht verdaulichen Mono- und Disacchariden im Medium.

Einen Schwerpunkt der Untersuchungen bildete die Quantifizierung ausgesuchter Stoffwechsellösungen der Weißfäuleerreger *Sporotrichum pulverulentum* (Novobrunna) (Abb. 1) (syn. *Phanerochaete chrysosporium*) und *Pleurotus ostreatus* [(Jacq. ex

Fr.) Kumm.] auf Haferstroh als Wachstumssubstrat. Die Stoffwechsellösungen dieser Organismen auf unbehandeltem Haferstroh (Grundsubstrat) (Abb. 2) wurden verglichen mit denjenigen auf definiert variiert aufgebesserten Grundsubstraten und zwar durch Zusatzdüngung mit verschiedenen Stickstoffverbindungen, C/N-Verbindungen und auf teilweise entlignifiziertem Grundsubstrat.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen konnten Rahmenbedingungen für das Kohlenstoff- und Stickstoffangebot definiert werden, die es auch auf komplexen lignocellulosehaltigen Restrohstoffen ermöglichen, pilzliche Stoffwechsellösungen selektiv zu beeinflussen. Trotz organismusspezifischer Unterschiede in der Leistungsfähigkeit und hinsichtlich der Substratansprüche für Kohlenstoff und Stickstoff bestimmt die physiologisch verwertbare C-Quelle des Substrats den Erfolg einer zusätzlichen Stickstoffdüngung und damit die Zielrichtung für die Möglichkeit einer Verbesserung der Substratnutzung:

- Wachstumslimitierende Kohlenstoffbedingungen schaffen die Voraussetzung für eine Stimulierung von Prozessen des Sekundärmetabolismus durch Stickstoff, verbunden mit gesteigerter Lignolyse (s. Abb. 3 a, b).

- Nicht wachstumslimitierende Kohlenstoffbedingungen führen bei Stickstoffdüngung primär zu Wachstumsschüben des pilzlichen Organismus und höchstens indirekt und mit entsprechender zeitlicher Verzögerung zur Stimulierung von entsprechenden Prozessen im Sekundärmetabolismus.

Es gibt also nicht **den** Stickstoffeffekt auf pilzliche Stoffwechselleistungen. Dies ist prinzipiell auch nicht zu erwarten bei einem Nährstoff, der in so hohen Konzentrationen und für so unterschiedliche Zwecke gebraucht wird. Es gibt aber auch im Prinzip nicht **den** Stickstoffbedarf für einen pilzlichen Organismus. Der Stickstoffbedarf ist offensichtlich abhängig von Höhe und Art des Kohlenstoffangebotes und variiert darüber hinaus in verschiedenen physiologischen Phasen (Primär- und Sekundärmetabolismus).

Die potentielle Bedeutung einer biologischen Substrataufwertung lignocellulosehaltiger Restrohstoffe erscheint momentan im Hinblick auf die Problematik der landwirtschaftlichen Überproduktion gering. Sie kann aber mittelfristig interessant werden, berücksichtigt man die zunehmende Belastung landwirtschaftlicher Nutzflächen und den sehr hohen Energieeinsatz der heutigen Agrarproduktion.

Sehr viel augenfälliger wird die Bedeutung der biologischen Substrataufwertung von bisher ungenutzten lignocellulosehaltigen Restrohstoffen (z. B. Rückstände der Baumwoll- und Juteproduktion) für Län-

der der Dritten Welt, wo Futtermittelmangel den wesentlichen, limitierenden Faktor der Nutztierproduktion darstellt. Die Dringlichkeit der Entwicklung leistungsfähiger biologischer Verfahren zur Entgiftung belasteter Böden ist demgegenüber gerade für hochindustrialisierte Staaten mit hoher Siedlungsdichte offensichtlich.

Ob die biotechnologische Anwendung von Weißfäuleerregern wirtschaftliche Bedeutung gewinnt, kann momentan noch nicht übersehen werden. Für die grundlagenorientierte Forschung sind Weißfäuleerreger wie *Sporotrichum pulverulentum* und *Pleurotus ostreatus* schon seit Jahren Modellorganismen, um Cellulolyse und Lignolyse besser verstehen zu lernen. Parallel dazu wird von europäischen und amerikanischen Arbeitsgruppen das genetische Potential dieser Modellorganismen intensiv erforscht, um letztlich auch zellfreie Systeme zur Cellulolyse und Lignolyse zu entwickeln.

Modellcharakter haben die Weißfäuleerreger sicher auch im Hinblick auf die Fragwürdigkeit einer wertenden Einteilung der Pflanzenwelt in Nutzpflanzen und Schädlinge.

## Kein Diplom-Mediziner

(*dpa*) – Die Bundesregierung hat vorerst auf ihren Plan verzichtet, neben dem bisherigen approbierten Arzt noch einen zweiten Medizinerberuf für Tätigkeiten in der Pharmaindustrie oder der Forschung zu schaffen. Die zuständige Bundesgesundheitsministerin Rita Süßmuth (CDU) erklärte, dies bedeute aber grundsätzlich keinen Verzicht, vielmehr sollten die Überlegungen in die Kultusministerkonferenz der Länder (KMK) hineingetragen und dort weiterdiskutiert werden.

Die Absicht der Bundesregierung, den Universitäten die Vergabe von Titeln wie „Diplom-Mediziner“ oder „Magister der Medizin“ zu ermöglichen, war auf entschiedenen Widerspruch bei Berufsverbänden und Studenten gestoßen. Der Präsident der Bundesärztekammer, Karsten Vilmar, hatte vor einer Spaltung des Arztberufes in Theoretiker und Praktiker gewarnt. Die Fachschäftskonferenz Medizin der Vereinigten Deutschen Studentenschaften nannte es einen Skandal, Ärzte erster und zweiter Wahl auszubilden.