

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ СУБСТРАТОВ НА БИОСИНТЕЗ ФЕРМЕНТОВ ЛИГНОЛИТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА ГРИБОМ *P.TIGRINUS*

Исследовано влияние полимерных субстратов на процесс биосинтеза ферментов лигнолитического комплекса грибом *P.tigrinus* ВКМ F-3616D при глубинном культивировании. Показано, что внесение целлолигнина в среду снижает активность ферментов лигнолитического комплекса. Березовые опилки в концентрации 2% повышают Mn-пероксидазную и глюкозооксидазную, а в концентрации 5% лакказную и пероксидазную активности.

Введение

В настоящее время базидиальные грибы привлекают внимание многих исследователей. Особое место среди них занимают грибы «белой гнили» из-за способности разрушать лигнин и его производные. В литературе имеются данные о том, что эти грибы можно использовать для отбеливания бумаги, получения ферментов и других биологически активных веществ, биоконверсии лигнинсодержащих отходов (7, 12). Еще одним перспективным направлением является использования грибов белой гнили в производстве экологически безопасных композиционных материалов. В результате предыдущих исследований нами было показано, что гриб *P. tigrinus* ВКМ F-3616D обладает высокой лигнолитической активностью и продуцирует комплекс ферментов – пероксидазу растительного типа, несколько изоформ лакказы, Mn-пероксидазу и глюкозооксидазу (1). Целенаправленная модификация отходов древесины этим грибом позволяет получить пластики без применения токсичных связующих (2, 4). Длительность обработки отходов грибом занимает несколько суток и зависит от многих факторов и прежде всего от лигнолитической активности. Повышение активности гриба позволило бы сократить продолжительность биомодификации и снизить себестоимость плит. Одним из наиболее простых путей решения этой проблемы является применение индукторов, в качестве которых могут выступать полимерные субстраты.

Целью работы было подбор индукторов для повышения лигнолитической активности гриба *P.tigrinus*.

Методы исследования

Гриб пилолистник тигровый – *P. (L.) tigrinus* был выделен на кафедре биотехнологии Мордовского государственного университета имени Н.П. Огарева из сухих плодовых тел, растущих на березовом валежнике в окрестностях Саранска, и депонирован в ВКМ РАН как штамм ВКМ F-3616 D (5).

Инокулят *P. tigrinus* выращивали на среде Чапека-Докса, содержащей 20 г/л кукурузного экстракта (по сухим веществам). Гриб со скошенного суслоагара высевали в жидкую питательную среду. Кусочек заросшего агара вносили в конические колбы Эр-

ленмейера объемом 500 мл с 100 мл питательной среды и выращивали 4 сут. при 26° на круговых качалках (235 об/мин). Инокулят объемом 5 мл вносили в экспериментальные питательные среды.

При изучении влияния соотношения азота и углерода на лигнолитическую активность гриб культивировали на жидкой питательной среде следующего состава (на 1 л): глюкоза – 3 г; KH_2PO_4 – 1 г; NaH_2PO_4 – 0,26 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,317 г; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 мг; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 74 мг; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 6 мг; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 5 мг; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 5 мг; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 1 мг; (9). В средах варьировали концентрацию полимерных субстратов целлолигнина и березовых опилок от 0,5 до 5%. Культуру гриба выращивали глубинным способом при температуре 26°C в конических колбах Эрленмейера объемом 500 мл со 100 мл питательной среды в течение 12 сут. на круговых качалках со скоростью 235 об/мин. В процессе культивирования каждые два дня отбирали пробы. Пробы центрифугировали при 6000 об/мин 10 мин. В супернатанте определяли активность пероксидазы, лакказы и Mn-пероксидазы – по окислению ABTS («ICN», USA) (9). Начальную скорость реакции измеряли на спектрофотометре СФ-46 («Ломо», Россия). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее окисление 1 мкм субстрата в течение 1 мин. при оптимальных условиях. Также определяли концентрацию белка спектрофотометрически по методу Бредфорд, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин («BDH biochemicals», England) (8).

Реактивы. В работе использованы реактивы 2,2'-азино-бис(3-этил-бензтиазолин-6-сульфонат) аммония (АБТС) – «ICN» (USA), бычий сывороточный альбумин – «BDH biochemicals» (England). Остальные реактивы – отечественного производства марки х. ч., ч. д. а. и ч.

Результаты и их обсуждение

Введение целлолигнина в культуральные среды оказало неблагоприятное действие на синтез лигнолитических ферментов грибом *Panus tigrinus*. Синтез Mn-пероксидазы на средах с варьированием концентрации целлолигнина был в 2,5 раза ниже, чем в контрольной среде (рис. 1). При этом на среде с мак-

симальным содержанием целлолигнина – 5% активность не детектировалась. Аналогичная картина наблюдалась и при изучении влияния целлолигнина на синтез пероксидазы и лакказы грибом. Как общая, так и удельная активность (рис. 2) была выше на среде без целлолигнина, а при максимальном содержании его пероксидаза детектировалась на низком уровне, а лакказа не определялась. Неблагоприятное воздействие введения целлолигнина в питательные среды на биосинтез пероксидаз и лакказы грибом, вероятно, обусловлено наличием ингибирующих веществ, например остатков фурфурола, переходящих в культуральную среду из целлолигнина. Однако введение целлолигнина в среды для культивирования стимулировало биосинтез глюкозооксидазы грибом. Максимальный уровень биосинтеза глюкозооксидазы наблюдался на среде, содержащей 1% целлолигнина, что связано с наличием дополнительного источника углерода – целлюлозы, при гидролизе которой образуются большие количества глюкозы – субстрата глюкозооксидазы.

Иное влияние на биосинтез ферментов оказало добавление в питательные среды различных концентраций березовых опилок. При низких концентрациях растительного субстрата (0,5 и 1%) увеличения пероксидазной и лакказной активности в надосадочной жидкости не наблюдалось (рис. 3). Более высокие концентрации березовых опилок вызывали увеличение как пероксидазной, так и лакказной активности, что, вероятно, связано с индукцией низкомолекулярными продуктами деградации лигнина, например, вератровым спиртом, олиго- и дилигнолами и др., образующимися при биодеградации лигнинового компонента опилок грибом.

Вопрос о роли индукторов в проявление лигнолитической активности грибами до конца не выяснен. Несмотря на то, что лигнолитическая активность грибов белой гнили носит конститутивный характер и ее проявление не зависит от наличия лигнина или

его производных, уровень активности, включая титр отдельных ферментов, может быть повышен внесением лигнина или его аналогов. В литературе имеются достаточно сведений о том, что введение в среды вератрового спирта (он является одним из метаболитов гриба и продуцируется им в фазу вторичного роста) увеличивает лигниназную активность (9, 13, 15). При этом он не столько индуцирует синтез, сколько, вероятно, защищает фермент от инактивации (10). Добавление вератровой кислоты или нефенольного β -O-4 димера в среды культивирования гриба *Phlebia radiata* также оказывало стимулирующий эффект на синтез внеклеточных ферментов (14), а анисовый спирт в 2,5 раза увеличивал синтез Mn-пероксидазы грибом *P. tigrinus* 8/18 (3). Возможно также, что присутствие достаточного количества целлюлозы, кометаболизируемого субстрата, энергетически обеспечивает дополнительный синтез лигнолитических ферментов, образование возможных эффекторов лигнолитической системы, медиаторов электронного транспорта и пероксида водорода, необходимой для функционирования большинства лигнолитических ферментов.

Наиболее высокие пероксидазная и лакказная активности наблюдались на восьмые сутки культивирования на среде, содержащей 5% березовых опилок. Синтез Mn-пероксидазы увеличился почти в 5 раз при росте гриба в присутствии 2% березовых опилок. На этой среде была отмечена и максимальная удельная Mn-пероксидазная активность (рис. 4), т. е. введение лигноцеллюлозного субстрата оказало стимулирующее действие именно на синтез фермента, а не только увеличило общую активность культуры. Биосинтез глюкозооксидазы также повысился при введении в среду березовых опилок. Оптимальным вариантом, стимулирующим синтез данного фермента, была среда, содержащая 2% березовых опилок.

Различия в величинах оптимальных концентраций березовых опилок, вероятно, могут быть связа-

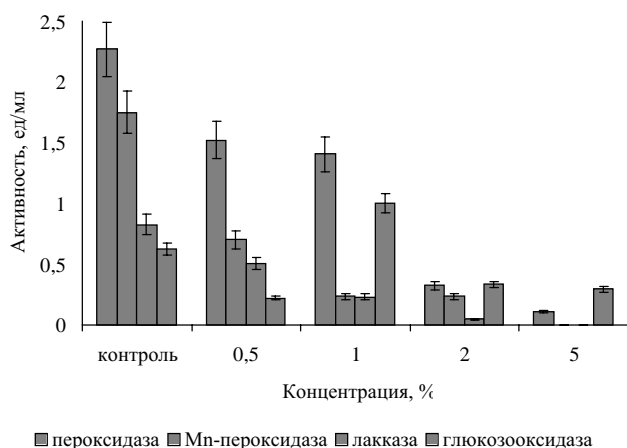


Рисунок 1.

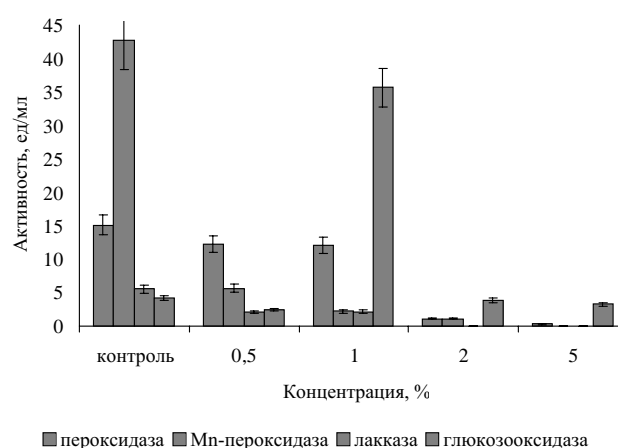


Рисунок 2.

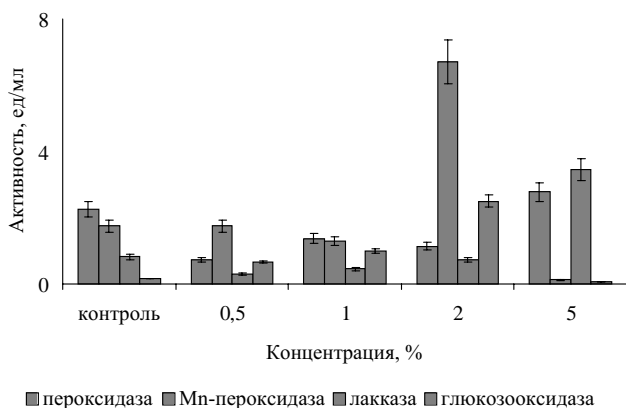


Рисунок 3.

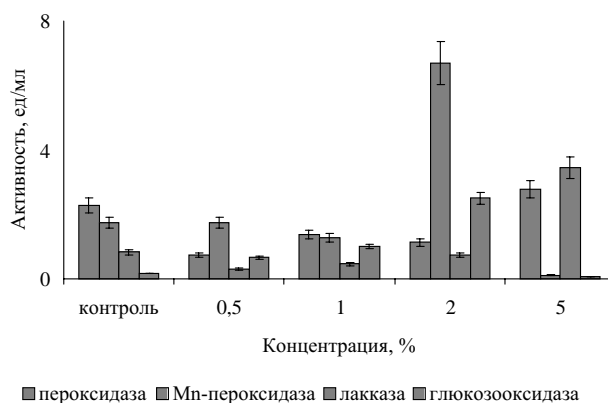


Рисунок 4.

ны с тем, что чувствительность отдельных ферментов к образующимся продуктам деградации полимера зависит как от количества этих продуктов, так и от химической структуры. Например, исследование субстратной специфичности лакказы по отношению к метоксифенольным соединениям, в том числе к ванилиновому спирту, о-ванилину – продуктам биодegradации березы, показало существенные различия в значениях кинетических констант (15).

Таким образом, добавление березовых опилок в среду повышает лигнолитическую активность гриба *P. tigrinus* и дает возможность регулировать синтез ферментов. Уровень биосинтеза отдельных ферментов лигнолитического комплекса гриба зависит от количества внесенного полимерного субстрата. Максимальная Mn-пероксидазная и глюкозооксидазная активность наблюдается при концентрации опилок 2%, а лакказная и пероксидазная – 5%.

Список использованной литературы:

- Атыкян Н.А., Ревин В.В., Кадималиев Д.А., Лафуткина Т.Т. Изучение роли ферментов лигнолитического комплекса гриба *P.tigrinus* ВКМ F-3616 D в биомодификации древесных отходов./Интеграция фундаментальной науки и высшего лесотехнического образования по проблемам ускоренного воспроизводства, использования и модификации древесины: Мат-лы Междун. Научно-практ. Конф (13-16 июня 2000 г.)-Воронеж, Воронеж.гос.лесотехн.акад., 2000 г.-С.109-113.
- Кадималиев Д.А., Ревин В.В., Шутова В.В. Влияние прессования на свойства лигнина древесины сосны, обработанной грибом *P.tigrinus*//Химия раст.сырья., 2001.-№3.-С.111-118.
- Мясоедова Н.М. Влияние условий культивирования на лигнолитическую активность гриба *Phanerochaete chrysosporium* и *Panus tigrinus*//Дис.на соиск.уч.степени канд.биол.наук, Пушкино, 1997.-132с.
- Ревин В.В., Кадималиев Д.А., Шутова В.В., Самуилов В.Д. Модификация лигнина древесины грибом *Panus tigrinus*//Прикл.био-хим. и микроб.,2002.-№38.-В.5.-С.450-453.
- Ревин В.В., Прыткова Т.Н., Лияськина Е.В., Черкасов В.Д., Соломатов В.И. Свидетельство о депонировании микроорганизма *Panus (Lentinus) tigrinus* (Bulliard:Fries) Fries,317. Регистрационный номер ВКМ F-3616D присвоен 5 марта 1998г.
- Смирнов С.А., Королева О.В., Гаврилова В.П., Белова А.Б., Клячко Н.Л. Лакказы базидиальных грибов: физико-химические характеристики и субстратная специфичность по отношению к метоксифильным соединениям//Биохимия., 2001.-Т.66.-В.7.-С.952-958.
- Элисашвили В.И. Биоконверсия растительного сырья высшими базидиомицетами//Микол. и фитопатол., 1993.-Т.27.-В.6.-С.83-92.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-drye binding//Anal.Biochem.,1976.-V.72.-P.248-254.
- Cancel A.M., Orth A.B., Tien M. Lignin and veratryl alcohol are not inducers of the lignolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*// Appl.Environ.Microbiol.,1993.-V.59.-№9.-P.2909-2913.
- Eggert C., Temp U., Eriksson K.E. The lignolytic system of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of laccase//Appl.Environ.Microbiol.,1996.-V.62.-№4.-P.1151-1158.
- Faison B.D., Kirk T.k., Farrell R.L. Role of veratryl alcohol in regulating ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*// Appl.Environ.Microbiol.,1986.-V.52.-P.251-254.
- Jie L., Guanying W. Antitumor polysaccharides from a chinese mushroom, «Juhuagmo», the fruiting body of *Pleurotus citrinopillatus*// Biosci.Biotechnol and Biochem.,1994.-V.58.-№7.-P.1195-1201.
- Kirk T.K., Croan S., Tien M., Murtagh K.-E., Farrell R.L. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of mutant strain//Enzyme Microb.Technol.,1986.-V.8.-P.27-32.
- Niku-Paavola M.-L., Karhunen E., Kantelinen A., Viikari L., Lundel T., Hatakke A. The effect of culture conditions on the production of lignin modifying enzymes by the white-rot fungus *Phlebia radiate*//J.Biotech.,1990.-V.13.-P.211-221.
- Tonon F., Odier E. Influence of veratryl alcohol and hydrogen peroxide on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*//Appl.Environ.Microbiol.,1988.-V.54.-P.466-472.