

## ВОЗДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИДАЗ ГРИБА И ХРЕНА НА ЛИГНОУГЛЕВОДНЫЙ КОМПЛЕКС БЕРЕЗЫ И СОСНЫ

Воздействие пероксидазы лигнолитического гриба *Panus (Lentinus) tigrinus* и хрена на лигноуглеводный комплекс древесины березы и сосны зависело от pH среды и присутствия перекиси водорода. Окисление ароматической части лигнинового компонента лигноуглеводных комплексов грибной пероксидазой происходило при pH 7,0 в присутствии перекиси водорода. В отсутствие перекиси фермент из гриба и хрена вызывал вторичную полимеризацию низкомолекулярных фрагментов ЛУК.

Биомодификация отходов растительного сырья грибами позволяет изготавливать экологически безопасные композиционные материалы без токсичных связующих [3, 5, 8]. Активными деструкторами древесины в природе являются лигнинразрушающие грибы, обладающие уникальным комплексом внеклеточных окислительных ферментов, способных изменять структуру и состояние лигниновой компоненты древесины и другого лигноцеллюлозного сырья. Среди этих ферментов важная роль отводится лакказе и пероксидазам – лигнинпероксидазе, Mn-зависимой пероксидазе [13, 18]. Между тем роль секреторных пероксидаз растительного типа, продуцируемых некоторыми лигнолитическими грибами, в том числе грибом *P. tigrinus*, в биодеградации древесины до конца не выяснена. В отличие от растений, пероксидаза которых участвует в биосинтезе лигнина [17], роль грибных пероксидаз в биотрансформации лигнина до конца не выяснена. По мнению одних авторов, они могут участвовать в разрушении лигнина путем его окисления пероксидом водорода, детоксикации образующихся продуктов деградации посредством их дальнейшего окисления или вторичной полимеризации [13], другие подвергают сомнению участие грибных пероксидаз в процессе биодеградации лигнина [2]. Вероятно, неоднозначность выводов связана с особенностями исследуемых штаммов, условий функционирования фермента. Кроме того, это не в последнюю очередь может быть обусловлено тем, что лигнин практически не растворим в водных средах, где функционируют ферменты. Поэтому исследователи обычно используют в качестве субстратов модифицированный лигнин или его аналоги, часто отличающиеся по своим свойствам от нативного лигнина.

Изучение воздействия очищенных препаратов пероксидазы на субстраты, близкие по своим характеристикам нативному лигнину, например лигноуглеводные комплексы (ЛУК), выделенные из различных пород древесины, позволило бы внести некоторую ясность в вопрос о роли этого фермента в биодеградации и биомо-

дификации лигноцеллюлозных субстратов.

Целью работы было изучение влияния условий среды на воздействие пероксидазы гриба *Panus (Lentinus) tigrinus* ВКМ F-3616 D и хрена на лигноуглеводные комплексы, выделенные из березовой (ЛУК-Б) и сосновой (ЛУК-С) древесины.

### 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 [6].

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

Гриб культивировали на жидкой питательной среде следующего состава (на 1 л): глюкоза – 3 г;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1 г;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – 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 [15]. Дополнительно в среду добавляли березовые опилки [7]. Культуру гриба выращивали глубинным способом при температуре 26° в конических колбах Эрленмейера объемом 500 мл со 100 мл питательной среды в течение 6-8 сут. на круговых качалках со скоростью 235 об/мин. Полученную культуральную жидкость центрифугировали при 6000 об/мин 10 мин. В супернатанте определяли активность пероксидазы – по окислению о-дианизидина («ICN», США) [21]. 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. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по методу Бредфорд, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин («BDH biochemicals», Англия) [12].

Пероксидазу гриба и хрена выделяли по методу, предложенному в работе [1], в нашей модификации [7]. Лигноуглеводный комплекс березы и сосны выделяли из древесины, подвергнутой механическому размолу на шаровой мельнице, экстракцией диметилсульфоксидом с 10% воды. Экстракт фракционировали на колонке с сефадексом G-75 («Pharmacia», Швеция), элюируя водой. Полученные фракции высушивали [9, 10].

Воздействие пероксидазы гриба и хрена на лигноуглеводный комплекс проводили в течение 3 часов, при различных значениях pH (3,6 – 7,0), используя 0,1 М ацетатный и фосфатный буфер. Реакционная смесь содержала 2,5 мл раствора ЛУК и ферментный раствор пероксидазы гриба или хрена с одинаковой активностью. В инкубационные среды вносили  $H_2O_2$  в конечной концентрации 0,1 мМ. Спектры поглощения растворов до и после воздействия ферментов снимали в диапазоне 200-440 нм на спектрофотометре Spеcord M-40 (ГДР). Для оценки степени воздействия пероксидазы на лигнинную компоненту ЛУК использовали  $K_v$  – коэффициент воздействия, показывающий отношение оптической плотности опытных растворов к контролю при 270-280 нм. При значениях  $K_v$  меньше 1,0 происходит деструкция полимера, при значениях больше 1,0 – образование новых ароматических компонентов [10].

Реактивы. В работе использованы реактивы о-дианизидин «ICN» (США), бычий сывороточный альбумин – «BDH biochemicals» (Англия). Остальные реактивы – отечественного производства марки хч, чда и ч.

**Результаты и их обсуждение**

УФ-спектры ЛУК-Б и ЛУК-С представлены на рис. 1. Выделенные комплексы имели сходные спектры с максимумом поглощения при длине волны 280 нм с выраженным плечом в области 300-360 нм, что указывает на присутствие лигнина [20]. При одной и той же концентрации интенсивность поглощения при длине волны 280 нм у ЛУК-С была выше, чем у ЛУК-Б. Это связано с более высоким содержанием лигнина в хвойных породах древесины по сравнению с лиственными [11].

Сравнение степени воздействия пероксидазы гриба на ЛУК различных пород древесины

показало, что характер воздействия ферментного препарата на ЛУК березы и сосны имеет одинаковую тенденцию и зависит от pH среды, присутствия перекиси водорода, а так же от источника ЛУК (рис. 2, рис. 3). В присутствии перекиси водорода пероксидаза гриба вызывала снижение  $K_v$ , как при воздействии на ЛУК-Б, так и на ЛУК-С, что связано с разрушением ароматического ядра лигниновой составляющей комплекса [19]. Минимальное значение оптической плотности наблюдали при pH 7,0, через 3 часа после воздействия фермента на ЛУК березы и сосны. При использовании ЛУК-Б  $K_v$  снизился наполовину, а при использовании ЛУК-С – на 38%.

В отсутствие перекиси водорода разрушение лигниновой компоненты ЛУК березы и сосны ферментом гриба не происходило. Более того, наблюдалось некоторое увеличение оптической плотности растворов при всех значениях pH. Причем этот эффект становился менее заметным при сдвиге pH с кислой в нейтраль-

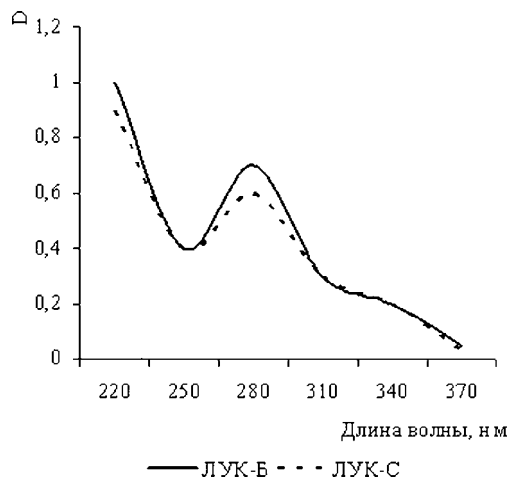


Рисунок 1. УФ-спектры лигноуглеводных комплексов из древесины березы и сосны

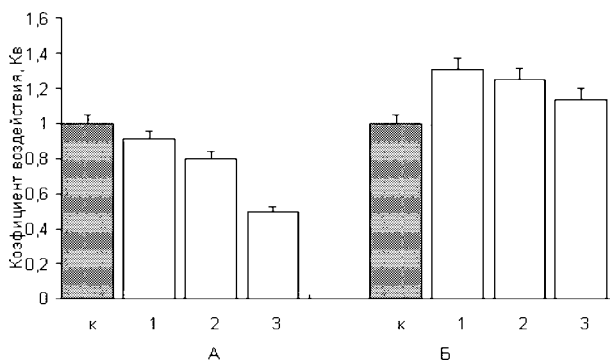


Рисунок 2. Воздействие пероксидазы гриба на ЛУК березы в присутствии (А) и отсутствии (Б) перекиси водорода, при разных значениях pH (1 – pH 3,6; 2 – pH 4,5; 3 – pH 7,0)

ную область. При рН 3,6 прирост  $K_B$  для среды с ЛУК-Б составил 31%, а при рН 7,0 – всего 15%. На среде с ЛУК-С максимальный прирост  $K_B$  наблюдали при рН 4,5.

Вероятно, это связано с тем, что в отсутствие перекиси водорода пероксидаза вызывает полимеризацию фрагментов лигниновой составляющей ЛУК. Другая возможная причина – вовлечение окисленных пероксидазой углеводов в процессы образования веществ с сопряженными двойными связями [9].

Пероксидаза хрена в присутствии перекиси водорода не изменяла  $K_B$  как при использовании ЛУК-Б, так и ЛУК-С (рис. 4, рис. 5), что указывает на отсутствие окислительных процессов в лигниновой компоненте комплексов. В отсутствие перекиси водорода наблюдалось незначительное увеличение  $K_B$  при всех значениях рН. Причем при сдвиге рН в нейтральную область прирост  $K_B$  возрастал. При рН 7,0 для среды с ЛУК-Б прирост  $K_B$  составил 24%, а для среды с ЛУК-С 30%. Увеличение интенсивности поглощения при длине волны 280 нм может быть связано с процессами полимеризации, происходящими в растворах ЛУК. Известно, что классическая растительная пероксидаза катализирует одноэлектронное окисление предшественников биосинтеза лигнина, генерируя фенокси-радикальные интермедиаты, которые диффундируют от фермента и связываются с другими, в результате чего происходит рост лигнинового компонента [17].

Роль и место грибных пероксидаз растительного типа в биотрансформации лигнина до конца не выяснены. Согласно данным литературы пероксидазы некоторых грибов осуществляют деструкцию лигнина при низких значениях рН, тогда как в слабокислой и нейтральной зоне рН происходит образование лигноподобных веществ с ароматическими структурами. В работе [10] показано, что пероксидаза гриба *Phelinus igniarius* в диапазоне рН 3,5–7,0 при отсутствии перекиси водорода осуществляет деструкцию ЛУК-Б. Причем при низких значениях рН эффект был более заметным. В присутствии перекиси водорода ферментный препарат гриба не оказывал разрушающего действия на ЛУК. По мнению авторов, пероксидаза гриба *Ph. igniarius* проявляет оксидазные свойства, когда в присутствии кислой пероксидазы и неактивированного кислорода воздуха происходит разрушение ароматической части лигниновой компоненты лигноуглеводного комплекса. В той же работе пероксидаза хрена не вызывала изменений в величине  $K_B$ , характеризующего измене-

ния в лигниновой компоненте ЛУК. Вместе с тем, как показано в работе [Cuerra et al., 2000], добавление системы пероксидазы хрена/пероксид водорода в сточные воды, содержащие растворимые фрагменты лигнина, вызывало образование коричневого осадка, вследствие полимеризации этих фрагментов. На возможность

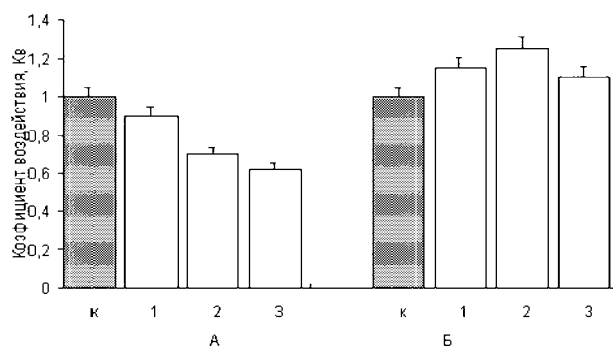


Рисунок 3. Воздействие пероксидазы гриба на ЛУК сосны в присутствии (А) и отсутствии (Б) перекиси водорода, при разных значениях рН (1 – рН 3,6; 2 – рН 4,5; 3 – рН 7,0)

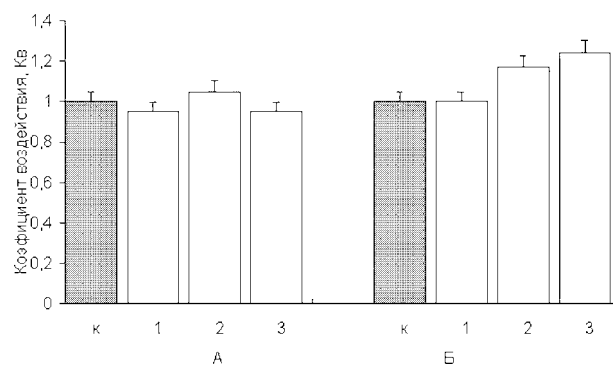


Рисунок 4. Воздействие пероксидазы хрена на ЛУК березы в присутствии (А) и отсутствии (Б) перекиси водорода, при разных значениях рН (1 – рН 3,6; 2 – рН 4,5; 3 – рН 7,0)

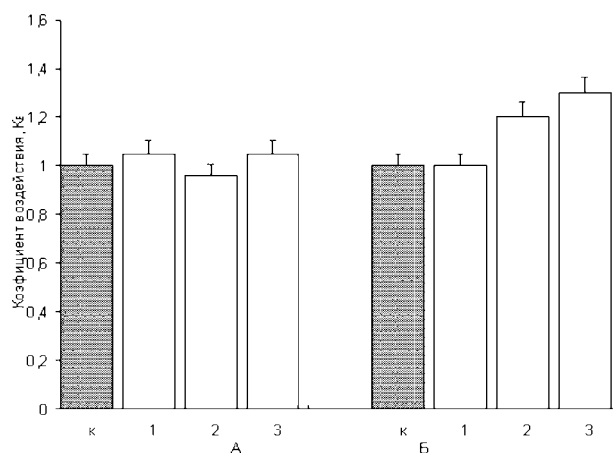


Рисунок 5. Воздействие пероксидазы хрена на ЛУК сосны в присутствии (А) и отсутствии (Б) перекиси водорода, при разных значениях рН (1 – рН 3,6; 2 – рН 4,5; 3 – рН 7,0)

участия пероксидаз в процессах полимеризации указывают и другие работы [13, 17].

Из наших исследований следует, что в отличие от гриба *Ph. igniarius* пероксидаза, продуцируемая грибом *P. tigrinus*, окисляет лигниновую компоненту ЛУК при более высоких значениях рН и в присутствии перекиси водорода. Ранее нами было показано, что гриб *P. tigrinus* при глубинном культивировании, в присутствии полимерных субстратов продуцирует пероксидазу с оптимумом рН 7,0, не характерным для грибов. Исследования субстратной специфичности показали, что фермент с большой долей вероятности можно отнести к секреторным пероксидазам растительного типа [7]. Известно, что растительная пероксидаза катализирует окисление субстратов двумя путями – пероксидазным и оксидазным [16]. В нашей работе мы наблюдали проявление пероксидазного эффекта фермента, продуцируемого грибом *P. tigrinus*, когда за счет атомарного кислорода пероксида водорода происходит окислительная деструкция ароматической части лигниновой компоненты ЛУК-Б и ЛУК-С. Аналогич-

ные свойства обнаружены и у других грибов. Например, пероксидаза, выделенная из гриба *Juninghuhnia separabilis*, проявляла оксидазные или пероксидазные свойства в зависимости от присутствия пероксида и типа субстрата [22].

Таким образом, исходя из полученных данных, можно предположить, что в отсутствие перекиси водорода пероксидаза гриба *P. tigrinus* проявляет аналогичные с пероксидазой хрена свойства и вызывает полимеризацию низкомолекулярных олиголигнинов. Окисление лигниновой компоненты ЛУК-Б и ЛУК-С пероксидазой гриба происходит в присутствии перекиси водорода и зависит от рН среды. В присутствии перекиси водорода, в меньшей степени в слабощелочной и в большей степени в слабощелочной и нейтральной среде, пероксидаза гриба вызывает окисление лигниновой компоненты ЛУК-Б и ЛУК-С.

**Работа выполнена при поддержке грантов Министерства образования и науки РФ Е.02-6.0-112 и Университеты России ур. 07.01.014.**

**Список использованной литературы:**

- Газарян И. Г., Решетникова И. А., Досеева В. В., Беккер Е. Г. Выделение и сравнительная характеристика пероксидазы гриба *Phrellinus igniarius* и табака // Биохимия, 1995. – Т. 60. – Вып. 7. – С. 1017 – 1022.
- Ганбаров Х. Г., Самедова Р. А. Биосинтез лакказы и пероксидазы у дереворазрушающего гриба *Coriolus versicolor*. // Изв. АН Аз. ССР. Сер. биол. наук, 1980. – №5. – С. 111 – 115.
- 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.
- Кадималиев Д. А., Ревин В. В., Атыкян Н. А. Влияние полимерных субстратов на биосинтез ферментов лигнолитического комплекса гриба *P. tigrinus*. // Вестник ОГУ, 2003. – №5. – С. 134 – 136.
- Кадималиев Д. А., Ревин В. В., Шутова В. В., Самуилов В. Д. Использование гриба *P. tigrinus* для производства прессованных материалов из отходов хлопчатника. // Прикл. биохим. и микроб., 2004. – Т. 40. – №1. – С. 49 – 52.
- 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 1998 г.
- Ревин В. В., Кадималиев Д. А., Атыкян Н. А., Ситкин Б. В., Самуилов В. Д. Выделение и свойства пероксидазы продуцируемой грибом *P. tigrinus*. // Биохимия, 2000. – Т. 65. – №11. – С. 1305 – 1309.
- Ревин В. В., Кадималиев Д. А., Шутова В. В., Самуилов В. Д. Модификация лигнина древесины грибом *P. tigrinus*. // Прикл. биохим. и микроб., 2002. – №38. – В. 5. – С. 450 – 453.
- Решетникова И. А., Елкин В. В. Воздействие дереворазрушающих грибов на лигноуглеводный комплекс березовой древесины при различных значениях рН среды. // Микроб., 1994. – Т. 63. – Вып. 6. – С. 1045 – 1049.
- Решетникова И. А., Елкин В. В., Газарян И. Г. Воздействие ферментного препарата пероксидазы гриба *Phrellinus igniarius* на лигноуглеводный комплекс березовой древесины. // Прикл. биохим. и микроб., 1995. – Т. 31. – №2. – С. 204 – 206.
- Boominathan K., Reddy A. C. Fungal degradation of lignin: biotechnological applications. Handbook of Appl. Mycol. New – York. 1992. – P. 763 – 822.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // *Anal. Biochem.*, 1976. – V. 72. – P. 248 – 254.
- Buswell J. A., Odier E. Lignin biodegradation. // *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 1987. – V. 6. – P. 1 – 60.
- Cuerra A., Ferrazz A., Cotrin A. R., da Silva F. T. P. Polymerization of fragment contained in a model effluent by polyphenoloxidases and horseradish peroxidase/hydrogen peroxide system. // *Enzyme Microb. Technol.*, 2000. – V. 26(5 – 6). – P. 315 – 323.
- Eggert C., Temp U., Eriksson K. E. The ligninolytic system of the white-rot fungus *Pycnoporus cinabarinus*: Purification and characterization of laccase. // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996. – V. 62(4). – P. 1151 – 1158.
- Gaspar T., Pennel C., Torpe T., Greppin H. Peroxidase 1970-1980. A survey their Biochemical roles in High plants., 1982. – Geneva. – P. 131 – 137.
- Higuchi T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. // *Wood Scien Technol.*, 1990. – V. 24. – P. 23 – 63.
- Kirk T. K., Farrell R. L. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. // *Annal. Rev. Microbiol.*, 1987. – V. 41. – P. 465 – 505.
- Stevanovich – Janezic T., Bujanovich B., Gelineo A. Transformation of the soluble part of kraft lignin by a microorganism screened from a pulp mill. // *J. Serb. Chem. Soc.*, 1993. – V. 10. – P. 751 – 758.
- Theander O., Westerlund E. Quantitative analysis of cell wall components. In: Jung H. G., Buxton D. R., Hatfield R. D. and Ralph (eds). Forage Cell Wall Structure and Digestibility. American of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin., 1993. – 794 pp.
- Ugarova N. N., Rozhkova G. D., Berezin I. V. Chemical modification of aminogroups of lysine residues in horseradish peroxidase and its effect on the catalytic properties and thermostability of the enzyme. // *Biochim. Biophys. Acta.*, 1979. – V. 570. – P. 31 – 42.
- Varies T., Lundell T. K., Hatakka A. I. Novel heme-containing enzyme possibly involved in lignin degradation by the white – rot fungus *Junghuhnia separabilis*. // *FEMS Microbiol. Lett.*, 1992. – V. 99. – P.53 – 58.