

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики  
Работа выполнена на базе УНЦ  
физико-химической биологии  
СГУ и ИБФРМ РАН

**ЛАККАЗА ПОДСТИЛОЧНОГО САПРОТРОФА STROPHARIA  
RUGOSOANNULATA DSM 11372: КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И  
УЧАСТИЕ В ДЕГРАДАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 422 группы

направления подготовки 06.03.01

биологического факультета

Баландиной Светланы Андреевны

Научный руководитель:

доцент СГУ к.б.н. Га— А.А.Галицкая  
13.06.2017

Научный консультант:

в.н.с. ИБФРМ РАН д.б. н. ННПозднякова Н.Н.Позднякова  
13.06.2017

Заведующий кафедрой биохимии и биофизики

д.б.н., профессор С.А.Коннова С.А. Коннова  
13.06.2017

Саратов 2017

Способность грибов разрушать древесину известна давно. Одними из наиболее активных деструкторов являются грибы, разрушающие в природе лигниновый компонент древесины (лигнинолитические). К ним относятся деревообитающие (грибы белой гнили; в англ. white rot fungi) и почвообитающие (подстилочные сапротрофы; в англ. litter-decomposing fungi) базидиомицеты и некоторые виды аскомицетов [1,2,3,4].

В настоящее время основная часть исследований проводится с деревообитающими грибами, тогда как вторая экофизиологическая группа лигнинолитических грибов – подстилочные сапротрофы играет важную роль в трансформации органического вещества почвы, в том числе в разрушении поллютантов. Вместе с тем сведений о деградации этими грибами ксенобиотиков недостаточно, нет данных об участии их лигнинолитического ферментного комплекса в данном процессе.

Ферментативная система этих грибов, катализирующая деградацию лигнина, является внеклеточной, неспецифической и окислительной, что позволяет им, кроме природного субстрата (лигнина), метаболизировать широкий спектр поллютантов и их смесей (хлорзамещенные соединения, синтетические красители, поверхностно-активные вещества, полициклические ароматические углеводороды и многие другие), давая, в ряде случаев, значительное преимущество перед бактериями и нелигнинолитическими грибами [5].

Основными лигнинолитическими ферментами являются лигнин пероксидаза, Mn-пероксидаза и лакказа [4].

Исторически сложилось, что исследование грибных лакказ начиналось с выяснения их роли в процессе деградации лигнина высшими грибами. Позже было показано, что кроме деградации лигнина, лакказы, на разных этапах, участвуют в метаболизме широкого ряда ксенобиотиков ароматической природы. До настоящего времени основная часть исследований грибных лакказ проводится с ферментами деревообитающих лигнинолитических грибов, тогда как сведений о лакказах подстилочных сапротрофов немного, в основном они сводятся к выявлению активности этого [8,9,11,10,12,15]. Данные о структурных и каталитических особенностях лакказ подстилочных сапротрофов недостаточны, почти нет сведений об их роли в деградации этими грибами лигнина и ксенобиотиков.

Цель работы: Изучение каталитических свойств и участия лакказы в деградации ксенобиотиков подстилочным сапротрофом *Stropharia rugosoannulata* DSM 11372.

Задачи:

1. Изучение деградативной активности подстилочного сапротрофа *Stropharia rugosoannulata* DSM 11372 по отношению к поллютантам.

2. Подбор условий культивирования гриба *Stropharia rugosoannulata* DSM 11372 для получения максимальной продукции лакказы.

3. Разработка схемы очистки и получение лакказы.

4. Характеристика лакказы и выявление ее активности по отношению к ксенобиотикам.

### **Основное содержание работы**

Работа состоит из 5 частей: введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть включает обзор современной научной литературы по теме исследования, который включает следующие разделы:

- Подстилочные сапротрофы в царстве грибов.
- Деградативные свойства подстилочных сапротрофов.
- Деградация природных субстратов.
- Деградация ксенобиотиков.
- Лигнинолитическая ферментная система подстилочных сапротрофов.
- Mn-пероксидаза.
- Лакказа.

Далее в разделе Материалы и методы описаны основные объекты и методы, использованные в работе:

- Объект исследований и методы культивирования.
- Исследование деградативной активности грибов.
- Изучение деградации полиароматических углеводородов (ПАУ).
- Синтетические красители антрахинонового типа.
- Изучение деструктивной активности по отношению к неионогенным поверхностно-активным веществам (НПАВ) коллометрическим методом.
- Изучение деградации нефти.
- Определение эмульгирующей активности.

- Получение грубых препаратов внеклеточных ферментов.
- Очистка лакказы *St. rugosoannulata*.
- Определение активности фермента.
- Электрофорез.
- Изучение деградтивных свойств *St. rugosoannulata*.

Наши исследования показали, что все три исследованных ПАУ грибом разрушались: фенантрен на 55,2%, антрацен – на 49,5%, флуорен – на 72,3%

Использование ГЖХ позволило также выявить и идентифицировать основные продукты деградации ПАУ. Так метаболит фенантрена со временем удерживания 6,87 мин соответствовал стандарту – фенантрен-9,10-хинону, метаболит антрацена со временем удерживания 5,39 мин – 9,10-антрахинону. Было выявлено наличие двух метаболитов флуорена со временами удерживания 1,59 мин и 3,09 мин. Сравнение времен удерживания этих веществ с таковыми стандартных соединений позволило нам идентифицировать их как 9-флуоренол и 9-флуоренон.

Известно, что растворимость ПАУ в водных растворах очень низкая (0,003-1,3 мг/л) и биодоступность этих соединений может быть лимитирующим фактором для микробной атаки. Ранние исследования показали, что другой лигнинолитический гриб – *Pleurotus ostreatus D1* в процессе деградации ПАУ продуцировал эмульгирующее вещество. Предполагаются две возможные функции этого вещества: увеличение растворимости гидрофобных субстратов и их участие в реакциях, катализируемых лигнинолитическими ферментами.

Нами также была исследована продукция эмульгирующих веществ в процессе деградации трехкольцевых ПАУ *St. rugosoannulata*. Обнаружено, что деградация всех исследуемых ПАУ этим грибом сопровождалась продукцией эмульгирующих веществ. Величины E48 составляли 26,9% для фенантрена, 41,8% для антрацена и 45,6% для флуорена. Следует отметить, что в контрольном варианте (без ПАУ) эмульгирующая активность не превышала 1-2%.

По данным литературы лигнинолитическая ферментная система грибов катализирует ключевые этапы деградации ароматических веществ, в том числе ПАУ. Нами была исследована продукция лигнин пероксидазы, Mn-пероксидазы, гибридной пероксидазы и лакказы грибом *St. rugosoannulata* в процессе деградации фенантрена, антрацена и флуорена. Обнаружено, что как в контроле (без ПАУ), так и в присутствии ПАУ гриб продуцировал два фермента: лакказу и Mn-пероксидазу. При этом,

независимо от использованных условий, продукция Mn-пероксидазы начиналась раньше и достигала максимума на 7-10 сут, тогда как продукция лакказы начиналась с 10-12 сут, достигая максимума на 19-20 сут. При этом активность лакказы превышала активность Mn-пероксидазы более чем в 2 раза, независимо от использованного ПАУ.

Синтетические красители также представляют собой опасные поллютанты. Они попадают в окружающую среду из стоков лакокрасочной и текстильной промышленности. Известно, что лигнинолитические грибы обесцвечивают, разрушая хромофорную часть молекулы, и минерализуют целый ряд природных и синтетических красителей, относящихся к различным химическим группам. Антрахинон занимает центральную часть молекул целого ряда синтетических красителей, так называемого, антрахинонового типа, в связи с чем они проявляют высокую устойчивость к биodeградации.

Из-за оптической непрозрачности богатой среды для базидиомицетов обесцвечивание красителей грибами мы исследовали только на среде Кирка. Обнаружено, что через 7 сут культивирования гриб *St. rugosoannulata* полностью обесцвечивал красители АВ62 и RB4.

Заметное снижение в ультрафиолетовой области в спектре поглощения RB4 позволяет предположить разрушение ароматического кольца этого красителя. В конце эксперимента, когда красители были полностью обесцвечены, были выявлены активности двух ферментов: лакказы (10,5 Ед./мл) и Mn-пероксидазы (1,3 Ед./мл).

Неионогенные поверхностно-активные вещества, в том числе оксиэтилированные алкилфенолы (ОЭАФ), характеризуются уникальными свойствами, сочетающими способность снижать поверхностное натяжение жидкостей в широком диапазоне рН и температур с высокой устойчивостью к разложению. В связи с этим они находят широкое применение в промышленности и быту. ОЭАФ характеризуются слабой антимикробной активностью, однако их биоразложение происходит с большим трудом, зачастую приводя к образованию устойчивых и токсичных алкилфенолов в качестве конечных продуктов биоразложения. Биodeградация ОЭАФ бактериями изучена достаточно хорошо. Что же касается их разрушения грибами, то подобных сведений крайне мало.

В качестве представителя ОЭАФ в нашей работе использовался оксиэтилированный нонилфенол АФ9-12. Группа алкилфенолов, как указывалось выше, являющаяся продуктами неполной деградации ОЭАФ, в нашем исследовании представлена изононилфенолом.

Обнаружено, что оба исследованных вещества разрушались грибом. Убыль неонала АФ9-12 составляла 20%, при этом деградация затрагивала ароматическое кольцо, тогда как оксиэтильная цепочка оставалась интактной.

Изононилфенол оказался токсичным для *St. rugosoannulata*, количество мицелия в его присутствии не превышало 40% от такового в контрольном варианте (без поллютанта). Несмотря на это, изононилфенол разрушался грибом, убыль составила также около 20%. Было обнаружено, что в присутствии этого вещества, также как и в присутствии ПАУ, гриб продуцирует эмульгирующие вещества. Эмульгирующая активность (E48) составляла 9,8%.

Деградация этих веществ также сопровождалась продукцией лакказы (6-8 Ед./мл) и Mn-пероксидазы (0,9-1,3 Ед./мл).

В результате природных процессов и хозяйственной деятельности человека в окружающую среду попадают сложные смеси поллютантов, в том числе нефть. Для ремедиации почв, загрязненных подобными смесями, широко обсуждается перспектива использования. Нами была исследована способность *St. rugosoannulata* метаболизировать нефть в условиях погруженного культивирования.

Было обнаружено, что через 14 сут культивирования гриб деградировал до 85,7% нефти при стартовой концентрации 0,5 г/л. На рисунке 7 представлен рост гриба в условиях погруженного культивирования. Нефть была эмульгирована и наблюдалось образование пены. По-видимому, в процессе деградации этого гидрофобного субстрата, так же как ранее нами было обнаружено при деградации ПАУ, данный гриб продуцирует вещества с эмульгирующей активностью, которые могут делать нефть более доступной. Эмульгирующая активность среды (E48) достигала 44%.

Деградация нефти, также как и деградация других исследованных нами поллютантов, сопровождалась продукцией двух лигнинолитических ферментов: лакказы (15,3 Ед./мл) и Mn-пероксидазы (4,8 Ед./мл).

Таким образом, нами было показано, что почвообитающий базидиомицет *St. rugosoannulata* является активным деструктором широкого спектра поллютантов. Деградация всех исследованных веществ сопровождалась продукцией двух лигнинолитических ферментов, при этом лакказа доминировала. Для выявления участия этого фермента в деградации необходима была его очистка и характеристика.

На первом этапе исследований нами был проведен подбор условий культивирования гриба для получения максимальной продукции лакказы. Выбраны среды, которые наиболее часто используют для получения этого фермента у лигнинолитических грибов.

Ранее было показано, что компоненты богатой среды для базидиомицетов поддерживают высокий уровень активности лакказ грибов *Pleurotus ostreatus* D1 и *Trametes versicolor* DSM. Однако, как видно из рисунка 8 на среде Bioclean *St. rugosoannulata* продуцировала более чем 20 раз больше лакказы, чем на богатой среде для базидиомицетов. По-видимому, регуляция продукции этого фермента может отличаться у грибов белой гнили (*Pleurotus ostreatus* D1 и *Trametes versicolor* DSM) и подстилочных сапротрофов (*St. rugosoannulata*).

Электрофоретический анализ показал наличие только одной формы лакказы в течение всего времени культивирования *St. rugosoannulata* на Bioclean.

Таким образом, по результатам этого эксперимента для получения лакказы нами была выбрана среда Bioclean.

Для получения грубого ферментного препарата гриб культивировали на среде Bioclean до достижения максимума продукции фермента. Культуральную жидкость и мицелий разделяли фильтрованием, культуральную жидкость использовали далее как грубый ферментный препарат лакказы.

Использование фракционирования сульфатом аммония позволило сконцентрировать ферментный препарат, а также удалить часть балластных веществ, в том числе пигменты.

После диализа лакказу подвергали гель-фильтрации на колонке Sephacryl S-200, активные фракции собирали и концентрировали. Заключительным этапом очистки была ионообменная хроматография на колонке DEAE-Toyopearl. Фермент элюировали градиентом NaCl (0-0,5 М) в 50 мМ NaK-фосфатном буфере pH 6,0. Лакказа связывалась с анионообменным носителем и элюировалась при концентрации NaCl – 0,2 М. На этом этапе была получена лакказа высокой степени очистки (по данным электрофореза в денатурирующих условиях), которую далее использовали в экспериментах.

Молекулярную массу фермента методом гель-фильтрации определяли на колонке Sephacryl S-200 HR (Pharmacia, Швеция). Для калибровки колонки были использованы Dextran blue (2000 кДа), бычий сывороточный альбумин (66 кДа), пероксидаза хрена (44,2 кДа), миоглобин (17,8 кДа). Массу лакказы определяли по калибровочной кривой.

По данным гель-фильтрации масса лакказы *St. rugosoannulata* составляла 72 кДа.

Для изучения влияния температуры лакказу инкубировали при разных температурах в течение 24 ч. Обнаружено, что фермент был термостабильным и сохранял до 24% активности при инкубировании при 60°C в конце эксперимента. Это может быть результатом гликозилирования белка, что является характерным свойством для грибных лакказ.

Для полученного фермента определены оптимумы рН окисления основных субстратов. Они составляли 3,0 – для АБТС, 5,0 – для 2,6-диметоксифенола, 5,2 – для 2,7-диаминофлуорена, 5,0 – пирокатехин, 6,0 – для сиригальдазина. Выявленные нами величины рН типичны для лакказ из разных источников. Так, например, рН-Оптимумы реакций окисления АБТС лакказами из различных источников находятся в диапазоне 3,0-5,0 а сиригальдазина – около 6,0.

Были определены основные каталитические константы окисления этих субстратов: константа Михаэлиса – КМ, максимальная скорость реакции –  $V_{max}$  и число оборотов фермента –  $k_{cat}$ . Скорость окисления пирокатехина была низкой, поэтому каталитические константы достоверно определить не удалось.

Так наибольшим сродством лакказа *St. rugosoannulata* обладала к сиригальдазину. Окисление сиригальдазина также было показано для большинства исследованных лакказ, долгое время этот субстрат считали тестовым. Низкие величины КМ для большинства исследованных ферментов позволяют судить о высоком сродстве лакказ к этому субстрату.

Максимальная скорость реакции лакказы *St. rugosoannulata* была обнаружена к АБТС, для этого же субстрата показана наибольшее число оборотов. По данным литературы известные грибные лакказы также проявляют высокое сродство к этому субстрату. Нами была исследована активность лакказы *S. rugosoannulata* по отношению к ряду ароматических веществ, включая грибной метаболит – вератриловый спирт, димерное модельное соединение лигнина – адлерол, и некоторые ксенобиотики нонилфенол (поверхностно активное вещество), бисфенол А (входит в состав пластмасс), антрацен (полициклический ароматический углеводород).

Реакционная смесь содержала 50 мМ фосфатный буфер рН 6,0, 20 мкмоль субстрата, лакказу; в качестве медиатора был добавлен АБТС. Субстраты вносили в виде раствора в ацетонитриле, конечная концентрация которого в реакционной смеси не превышала 2%. Реакционные смеси инкубировали в закрытых флаконах в течение 2 суток, затем убыль исходных субстратов анализировали методом высокоэффективной жидкостной



хроматографии. В наших экспериментах обнаружено, что наиболее активному окислению подвергался нонилфенол, убыль составляла около 67%. Вератриловый спирт оказался плохо доступным для лакказы, его окисление не превышало 8%. Все остальные исследованные субстраты были доступными для фермента, их убыль варьировала от 30 до 49%. Обнаружено, что продуктом окисления антрацена является 9,10-антрахинон.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами было показано, что *Stropharia rugosoannulata* DSM 11372 является активным деструктором широкого спектра поллютантов, включая ПАУ (фенантрен, антрацен, флуорен), красители, содержащиеся в структуре конденсированные ароматические кольца, оксиэтилированные алкилфенолы, алкилфенолы и нефть. Обнаружено, что деградация ПАУ грибом проходит через этап образования соответствующих хинонов. Показано, что деградация ПАУ сопровождалась продукцией эмульгирующего вещества и основных лигнинолитических ферментов: лакказы и Mn-пероксидазы. Лакказа является доминирующим ферментом при деградации всех исследованных поллютантов.

Нами подобраны условия культивирования *St. rugosoannulata* DSM 11372 для продукции лакказы. Разработана схема очистки и фермент получен высокой степени чистоты. Лакказа была мономером с молекулярной массой 72 кДа. Показано, что лакказа сохраняет активность при инкубации при 60°C в течение 24 ч. Определены оптимумы pH для ряда субстратов, а также основные каталитические константы реакций их окисления. По основным каталитическим свойствам выделенный нами фермент является типичной грибной лакказой.

Способность лакказы окислять ряд ароматических веществ, включая грибной метаболит – вератриловый спирт, димерное модельное соединение лигнина – адлерол, и некоторые ксенобиотики (нонилфенол, бисфенол А, антрацен), позволяет предположить ее участие в деградации поллютантов исследуемым грибом.

### ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что гриб *Stropharia rugosoannulata* DSM 11372 обладает деструктивной активностью по отношению к ПАУ (фенантрону, антрацену и флуорену), красителям, содержащим в структуре конденсированные ароматические кольца, оксиэтилированным алкилфенолам, алкилфенолам и нефти.

2. Выявлены и идентифицированы продукты деградации фенантрена – фенантрен-9,10-хинон, антрацена – 9,10-антрахинону, флуорена – 9-флуоренол и 9-флуоренон.
3. Показано, что деградация поллютантов сопровождалась продукцией основных лигнинолитических ферментов: лакказы и Mn-пероксидазы.
4. Подобраны условия культивирования *Stropharia rugosoannulata* DSM 11372 для продукции лакказы. Разработана схема очистки и фермент получен высокой степени чистоты.
5. Лакказа была мономером с молекулярной массой 72 кДа. Фермент сохранял активность при инкубации при 60°C в течение 24 ч.
6. Определены оптимумы pH для ряда тестовых субстратов, а также основные каталитические константы реакций их окисления. Показано, что лакказа окисляла как димерное соединение лигнина, так и некоторые поллютанты.

