

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ
ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛАККАЗ, ЛИГНИН- И MN-ПЕРОКСИДАЗ
*AZOSPIRILLUM BRASILENSE***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВОРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4-го курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Карапетян Левона Александровича

Научный руководитель:

профессор, докт.биол.наук _____ С.А. Коннова

Научный консультант:

с.н.с. ИБФРМ РАН, канд. биол наук _____ М.А. Купряшина

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

профессор, докт.биол.наук _____ С.А. Коннова

Саратов 2020

Введение. Ферменты фенолоксидазного комплекса, в частности лакказы, лигнин- и MnП, являются перспективными для биотехнологического применения в связи с их способностью к деградации целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина и лигниноподобных соединений, органических загрязнителей, таких как полициклические ароматические углеводороды, хлорфенолы, промышленные красители и нитроароматические соединения.

В изучении строения, функционирования и регуляции активности фенолоксиляющих ферментов лигнинолитических комплексов грибов, были достигнуты значительные успехи за последние несколько лет. Однако в сравнении с другими биологическими объектами, каталитические свойства лакказ, лигнин- и марганец-пероксидаз могут отличаться. На данный момент данных о специфике продукции и свойств ферментов фенолоксидазного комплекса у бактерий не много. В серии экспериментов была установлена способность ряда штаммов бактерий родов *Azospirillum* к продукции ферментов фенолоксидазного комплекса, получены и частично охарактеризованы, гомогенные препараты лакказы, лигнин- и MnП *Azospirillum brasilense*. На эффективность практического применения фенолоксидаз, оказывают влияние многие факторы, поэтому особое внимание уделяется изучению стабильности ферментов в разных условиях. Сообщается, что в роли индукторов и ингибиторов фенолоксидаз могут выступать ионы металлов.

Поскольку биоремедиация стоков промышленных предприятий представляет несомненный интерес, а в сточных водах присутствуют ионы различных металлов, необходимо исследовать их влияние на процесс биоредукции ароматических соединений.

В связи с вышеизложенным, целью данной работы явилось выявление влияния ионов Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , Cu^{2+} на активность внеклеточных лакказ, лигнин- и Mn-пероксидаз бактерий *A. brasilense*.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Оценить уровень активности внеклеточных лакказ, лингин- и Mn-пероксидаз бактерий *A. brasilense* Sp245 и SR80 при культивировании в присутствии солей металлов $MnSO_4$, $CaCl_2$, $ZnSO_4$, $MgSO_4$, $CuSO_4$, $NaCl$ в различной концентрации.

2. Проанализировать влияние ионов Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , Cu^{2+} в среде культивирования на активность фенолоксидаз штаммов *A. brasilense* Sp245 и SR80.

3. Исследовать биодеколоризацию малахитового зеленого азоспириллами в присутствии ионов металлов.

Структура работы. Работа состоит из введения, основной части, материалов и методов, результатов и обсуждений, заключения, выводов и списка использованных источников. Обзор литературы составлен на основе анализа 144 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: краткая характеристика ферментов фенолоксидазного комплекса, влияние металлов на фенолоксидазную активность, роль фенолоксидаз в биодеколоризации синтетических красителей, основные представления о систематике и физиологии ассоциативных diaзотрофов рода *Azospirillum*, фенолоксидазная активность азоспирилл.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Результаты и обсуждение. Влияние ионов металлов на активность внеклеточных лигнин-пероксидазы, лакказы и Mn-пероксидазы азоспирилл

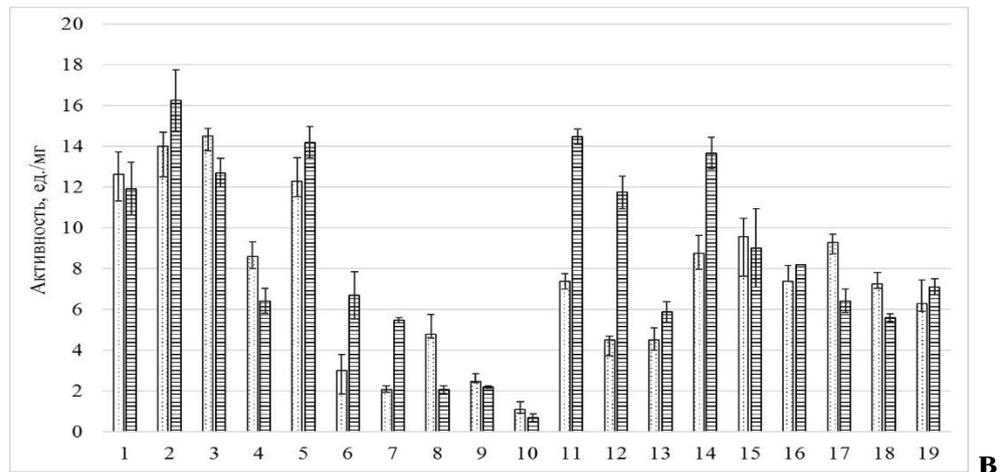
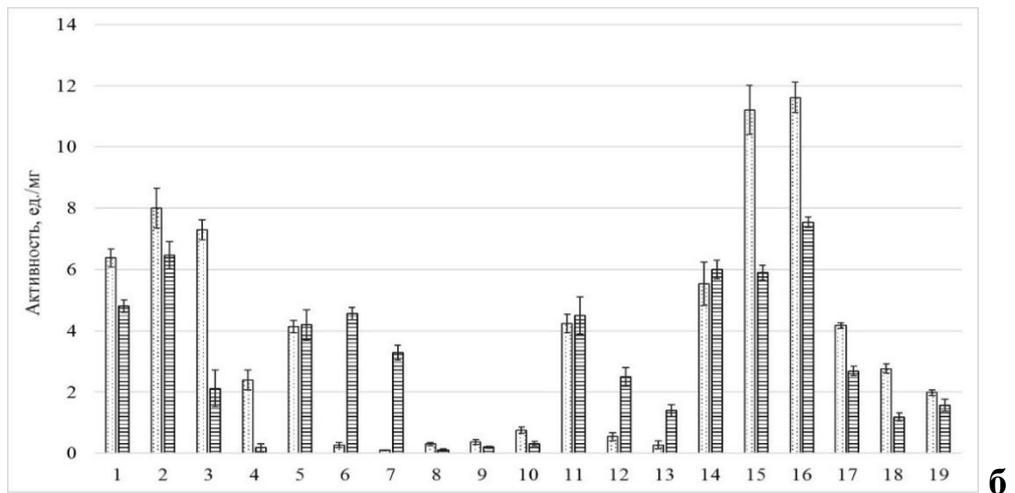
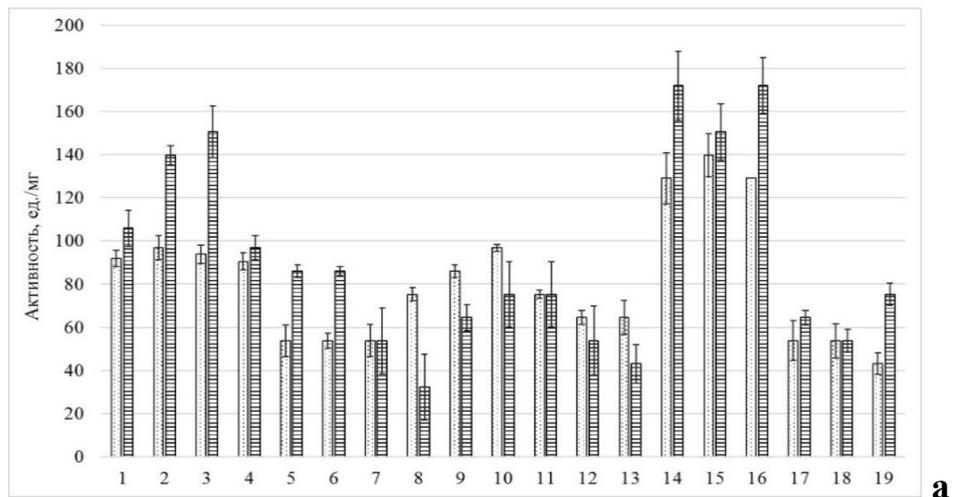
Было исследовано влияние ионов металлов на активность основных ферментов фенолоксидазного комплекса азоспирилл, а именно лакказ, лигнин- и Mn-пероксидаз. В эксперимент были взяты два штамма бактерий рода *Azospirillum*: *A. brasilense* Sp245 и SR80, для которых ранее были показаны высокие уровни продукции фенолоксиляющих ферментов, а также наибольшая эффективность деградации модельных соединений лигнина и азокрасителей. В условиях эксперимента при пассаже бактерий в среду

выращивания вносили MnSO_4 , CaCl_2 , ZnSO_4 , MgSO_4 , CuSO_4 , NaCl в концентрации 1, 5 и 10 мМ.

Известно, что стабилизация белковой глобулы фенолоксидаз в нативном состоянии происходит за счет ионов кальция. Однако, при добавлении ионов Ca^{2+} , в среде наблюдалось уменьшение активности лакказы и лигнин-пероксидазы в эксперименте для обоих штаммов (рисунок 1). При внесении в среду культивирования 1 мМ CaCl_2 , активность МпП у штамма *A. Brasilense* Sp245 несущественно повышалась, и снижалась при увеличении концентрации соли (рисунок 1). Так же активность ферментов обоих штаммов ингибировалась примерно на 50% при культивировании бактерий в присутствии соли натрия, даже при низких концентрациях соли в среде. Известно, что продукция как бактериальных, так и грибных лакказ ингибируется хлорид-ионами. Скорее всего уменьшение ферментативной активности азоспирилл связано с присутствием хлорид-ионов. При этом на продукцию ферментов, ингибирующее влияние затрагивает весь фенолоксидазный комплекс бактерий.

Тяжелые металлы, в целом, являются мощными ингибиторами ферментативных реакций. Присутствие ионов Zn^{2+} в среде культивирования *A. brasilense* приводило к снижению удельной активности лакказ и МпП взятых в эксперимент штаммов на 55-90% в зависимости от концентрации, однако не оказывало существенного влияния на активность лигнин-пероксидазы (рисунок 1). Полученные данные о влиянии цинка на ферменты фенолоксидазного комплекса азоспирилл, согласуются с работой Soni с соавторами, в которой показан ингибирующий эффект ионов цинка на активность лакказ, лигнин- и Мп-пероксидаз псевдомонад.

Медь также относится к тяжелым металлам и может вызвать окислительное повреждение белков путем индукции окислительного стресса, однако ионы Cu^{2+} являются кофакторами некоторых фенолоксидаз. Так лакказа принадлежит к семейству голубых оксидаз и содержит четыре атома меди в каталитическом центре.



1 – контроль, 2 – 1 мМ MnSO₄, 3 – 5 мМ MnSO₄, 4 – 10 мМ MnSO₄, 5 – 1 мМ CaCl₂, 6 – 5 мМ CaCl₂, 7 – 10 мМ CaCl₂, 8 – 1 мМ ZnSO₄, 9 – 5 мМ ZnSO₄, 10 – 10 мМ ZnSO₄, 11 – 1 мМ MgSO₄, 12 – 5 мМ MgSO₄, 13 – 10 мМ MgSO₄, 14 – 1 мМ CuSO₄, 15 – 5 мМ CuSO₄, 16 – 10 мМ CuSO₄, 17 – 1 мМ NaCl, 18 – 5 мМ NaCl, 19 – 10 мМ NaCl.

Рисунок 1 – Активность внеклеточной лигнин-пероксидазы (а), лакказы (б), Mn-пероксидазы (в) *A. brasilense* Sp245 (■) и *A. brasilense* SR80 (□) в присутствии солей металлов.

В ряде работ было исследовано внесение сульфатов меди в среду культивирования, и было показано, что ионы меди увеличивают лакказную активность бактерий и грибов. Медь регулирует продукцию лакказы на уровне транскрипции. Нами было определено увеличение активности лакказы азоспирилл в присутствии сульфатов меди (рисунок 1). У штамма *A. brasilense* Sp245 стимуляция ферментативной активности была незначительна, однако активность лакказы у штамма *A. brasilense* SR80 увеличилась в два раза при внесении в среду культивирования 10 мМ сульфата меди. Исследований о влиянии ионов меди на Mn- и лигнин-пероксидаз крайне мало. В данной работе показано, что при внесении CuSO_4 в концентрациях 0,1, 0,3, 0,5 и 1 мМ никаких ощутимых изменений в активности MnП не наблюдается. Однако показано, что внесение меди в среду культивирования в концентрации 50 мкг/мл не вызывает индукцию MnП активности, но при повышении концентрации меди до 500-1000 мкг/мл ферментативная активность увеличивается на 70 %.

Отмечается незначительная стимуляция активности при малых концентрациях ионов меди у лигнин-пероксидазы, при этом фермент ингибируется увеличенным содержанием ионов в среде. Данные, полученные нами в ходе эксперимента, говорят о стимуляции активности лигнин-пероксидазы сульфатом меди более, чем на 50%, у штамма *A. brasilense* Sp245 и на 80% для штамма SR80, по сравнению с контролем. Оба штамма показывают тенденцию к уменьшению ферментативной активности MnП в присутствии ионов Cu^{2+} , при этом нами была отмечена концентрационная зависимость. При концентрации ионов меди 10 мМ был отмечен максимальный ингибирующий эффект на активность внеклеточной MnП.

По данным литературы присутствие солей марганца в среде оказывает сильное влияние на продукцию Mn- и лигнин-пероксидаз. Для некоторых грибов установлено, что механизм действия Mn^{2+} на продукцию MnП идет уже на уровне транскрипции. При анализе данных, полученных в ходе

эксперимента, была установлена общая тенденция к индукции активности ферментов при низких концентрациях марганца в среде (рисунок 1). В это же время при культивировании бактерий с внесением в среду 10 мМ сульфата марганца, MnII активность штамма SR80 снижалась на 20%, Sp245 – на 50%, активность лакказы обоих штаммов детектировалась в крайне незначительных количествах, находящихся на пределе обнаружения аналитическими методами.

У взятых в эксперимент штаммов, высокие концентрации ионов Mg^{2+} снижали активность фенолоксидаз. Впрочем, активность MnII и лакказы штамма *A. brasilense* Sp245 увеличивалась при концентрации 0.1 мМ сульфата меди, в то время как для штамма SR80 детектировалось уменьшение активности ферментов. Из чего можно заключить, в ходе проведенной экспериментальной работы было выявлено влияние ионов металлов на ферментативную активность фенолоксидаз у азоспирилл. При анализе полученных нами данных с данными литературы, были обнаружены индукторы и ингибиторы активности фенолоксидаз, как грибного, так и бактериального происхождения. Были установлена общая направленность индукции фенолоксидазной системы азоспирилл ионами

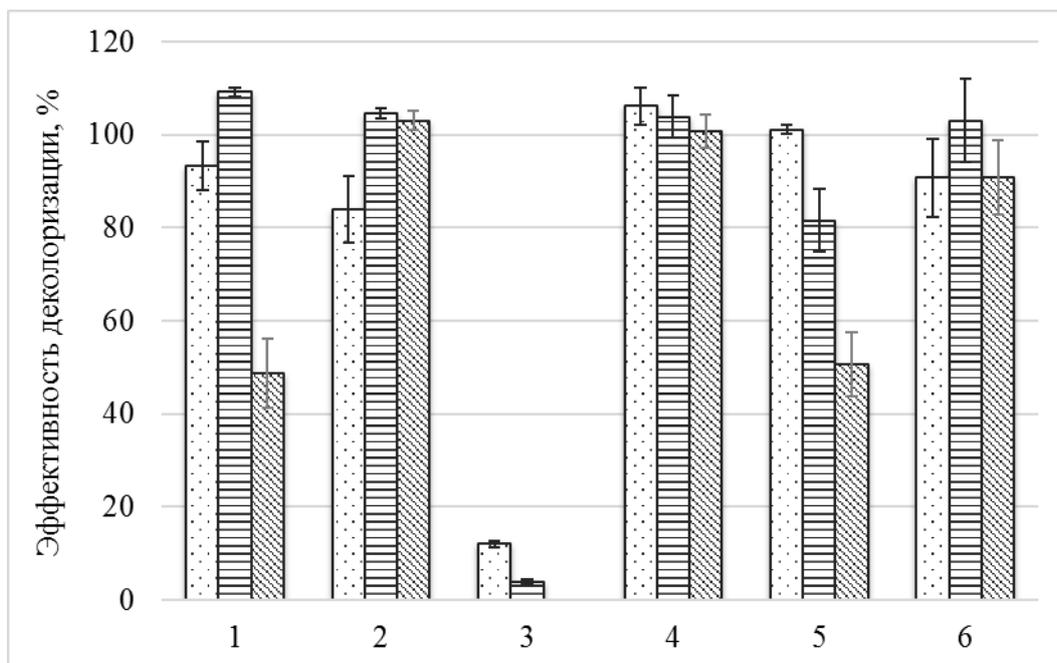
Исследование биodeградации синтетического красителя азоспириллами в присутствии ионов металлов

Современными темпами индустриализации обусловлены ежегодно растущие объемы отходов целлюлозно-бумажной, текстильной, косметической, полиграфической, фармацевтической и пищевой промышленности. Основная экологическая проблема, возникающая в последние годы – это очистка сточных вод от лигнино-подобных соединений и синтетических красителей, значительное количество которых попадают в стоки в неизменном виде. В связи с этим для минимизации экологических рисков, в последние годы активно идет поиск и разработка новых экологически чистых методов деградации синтетических красителей

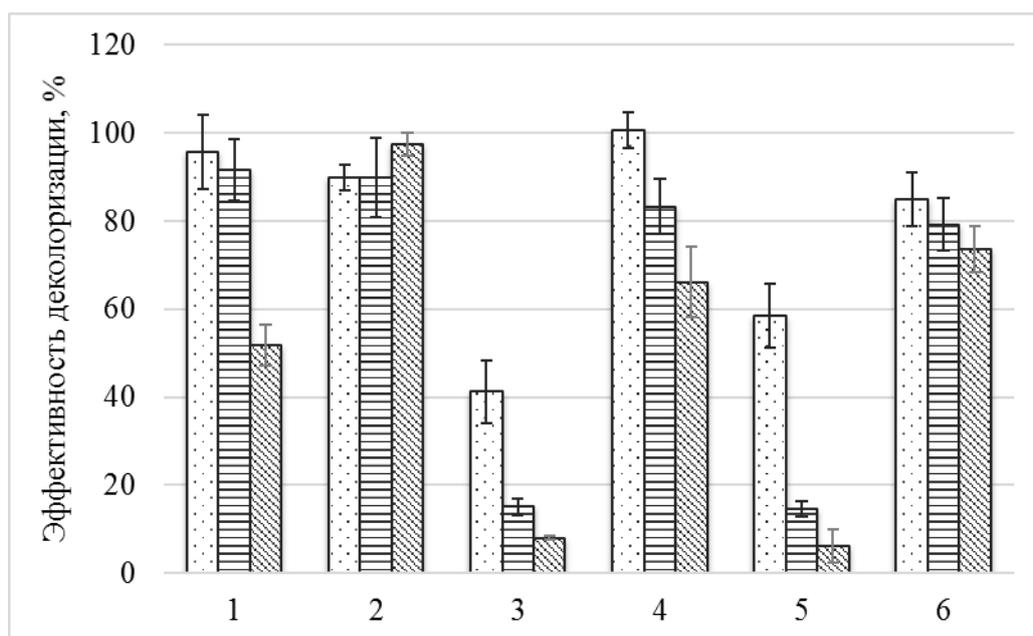
и отходов целлюлозно-бумажной промышленности. На сегодняшний день способность к биоразложению трифенилметановых красителей показана для некоторых бактерий и грибов, являющихся продуцентами ферментов фенолоксидазных и лигнинолитических комплексов, в том числе и для почвенных ассоциативных бактерий рода *Azospirillum*. Многие факторы способны индуцировать и ингибировать эффективность биодеградации, в частности ионы металлов, действие которых опосредуется как влиянием (в том числе и токсическим) непосредственно на биообъекты, так и на ферментативные системы, вовлеченные в процессы обесцвечивания. Одной из основных проблем, связанных с затруднением процессов деградации является наличие в сточных водах ионов металлов, таких как Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} . На этом этапе работы, мы проводили исследование влияния ионов металлов на обесцвечивание малахитового зеленого бактериями рода *Azospirillum*.

Выращивание бактерий штаммов *A. brasilense* Sp245 и SR80 в присутствии солей натрия на всех концентрациях не оказывало ощутимого влияния на деградацию малахитового зеленого (рисунок 2). Ионы марганца уменьшали эффект обесцвечивания красителя бактериями на половину, только при высоких концентрациях. Сульфат магния влиял на обесцвечивание красителя по-разному, если культивирование в присутствии ионов Mg^{2+} для штамма *A. brasilense* SR80 отмечалось снижение степени обесцвечивания малахитового зеленого на 15-35% в соотношении от концентрации, то для штамма Sp245 увеличивало эффект обесцвечивания на 10%.

Соли меди в среде культивирования очень быстро снижали декалоризацию среды штамма SR80. Наряду с этим для штамма Sp245 обесцвечивание ингибировалось исключительно большими концентрациями ионов Cu^{2+} . При анализе полученных нами данных и литературы, выявилось сходство с рядом работ, в которых было исследовано внесение сульфата меди в среду культивирования бактерий, при котором



а



б

1 – MnSO₄, 2 – CaCl₂, 3 – ZnSO₄, 4 – MgSO₄, 5 – CuSO₄, 6 – NaCl в концентрации 1 мМ (▤), 5 мМ (▨) и 10 мМ (▩).

Рисунок 2 – Влияние ионов металлов на эффективность биodeградации малахитового зеленого *A. brasilense* Sp245 (а) и *A. brasilense* SR80 (б).

снижается процесс биodeградации синтетических красителей, вместе с тем в нашей работе эффект декалоризации красителя штаммов *A. brasilense* Sp245 снижалась при внесении 1 мМ CuSO_4 , а при внесении более низких концентраций отмечалась активизация эффективности биodeградации.

Сильный ингибирующий эффект для исследуемых штаммов отмечался для солей цинка, в присутствие которых, даже не в больших количествах снижало эффект декалоризации красителя более чем в 8 раз. Для ионов Zn^{2+} отмечается концентрационная зависимость у обоих штаммов (рисунок 2). Однако у штамма *A. brasilense* Sp245 в присутствии 1мМ сульфата цинка обесцвечивание малахитового зеленого не происходило вообще.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано влияние солей металлов на продукцию внеклеточных MnII, лакказ и лигнин-пероксидаз штаммами *A. brasilense* Sp245 и SR80. Показано, что ферменты фенолоксидазного комплекса азоспирилл достаточно стабильны в присутствии исследуемых солей металлов. В ходе проведенного исследования показано, что ионы Zn^{2+} снижают активность лакказ и MnII азоспирилл, при этом отмечалось угнетение эффективности биodeградации синтетических красителей. Однако в присутствии ZnSO_4 не происходило снижение удельной активности внеклеточной лигнин-пероксидазы. В связи с чем можно предположить, что в деструкции данных ароматических соединений решающую роль играют лакказы и MnII. Ионы Mn^{2+} оказывали стимулирующий эффект на активность ферментов фенолоксидазного комплекса, однако внесение высоких концентраций марганца ингибировало активность всех исследуемых ферментов, что отражалось на процессах биodeградации.

В настоящее время в промышленности активно используются биокаталитические процессы с применением различных биообъектов и их ферментных систем. Поиск, дизайн и применение биокатализаторов в

различных отраслях промышленности – главные тенденции развития современной биотехнологии. Использование биообъектов в деградации и детоксикации различных органополютантов, в том числе синтетических красителей, позволяет создавать новые технологии для минимизации экологических рисков.

ВЫВОДЫ

1. Исследовано влияние солей металлов на продукцию внеклеточных Mn-пероксидаз, лакказ и лигнин-пероксидаз штаммами *A. brasilense* Sp245 и SR80. Показано, что ферменты фенолоксидазного комплекса азоспирилл достаточно стабильны в присутствии исследуемых солей металлов.

2. Влияние ионов металлов на активность внеклеточных фенолоксидаз было разнонаправленным. Были выявлены как сильные ингибиторы, такие как ионы цинка, так и активаторы, такие как ионы меди и марганца.

3. Установлена положительная зависимость между концентрацией ионов металлов, эффективностью деколоризации малахитового зеленого и уровнем фенолоксидазной активности. Наблюдалось снижение эффективности деколоризации малахитового зеленого на 50% при высоких концентрациях ионов Mn^{2+} и Cu^{2+} . Резкий ингибирующий эффект отмечался для ионов Zn^{2+} , присутствие которых даже в незначительных количествах снижало эффективность обесцвечивания малахитового зеленого более чем в 8 раз.