

ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. Ю.ФЕДЬКОВИЧА

на правах рукопису

Домбровська Олена Миколаївна

ВЛАСТИВОСТІ ЛІГНІНОЛІТИЧНИХ ТА ГІДРОЛІТИЧНИХ
МУЛЬТИФЕРМЕНТНИХ СИСТЕМ ДЕРЕВОРУЧІНЮЮЧИХ
БАЗИДИОМІЦЕТІВ.

03.00.04 – Біохімія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Чернівці 1994

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі біохімії та експериментальної екології Чернівецького держуніверситету ім. Ю.Федьковича

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Костишин Степан Степанович

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Мецишен Іван Федорович
доктор біологічних наук, професор
Терек Ольга Іштванівна

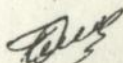
Провідна організація: Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна
АН України, м. Київ.

Захист дисертації відбудеться 26 грудня 1994 року о 15⁰⁰ год.
на засіданні спеціалізованої ради К 07.01.03 по присудженню наукового ступеня кандидата біологічних наук в Чернівецькому держуніверситеті (274012, м. Чернівці, Коцюбинського, 2).

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Чернівецького держуніверситету (274012, м. Чернівці, Л.Українки, 23).

Автореферат розісланий 24 листопада 1994 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



Копильчук Г.П.

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00777260 (Т)

В. Стефаника
Україна

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

Актуальність проблеми. Одним з провідних напрямків сучасної ензимології є вивчення закономірностей протікання та регуляції ферментативного каталізу в системах з різним рівнем структурної організації. Детально вивчені механізми дії багатьох індивідуальних ферментів на низькомолекулярні субстрати. Однак більшість ферментативних процесів є як поліферментними, так і полісубстратними. Так, біодеградація рослинних полісубстратів відбувається під дією багатокомпонентних ферментних систем макро- та мікроміцетів, де важливу роль відіграють регуляторні стосунки як між ферментом та компонентами полісубстрату, так і між окремими ферментами (Highley, 1987). До найбільш повної біодеградації рослинних полісубстратів здатні дереворуйнівні базидіальні гриби. Ефективна деструкція рослинних біополімерів значно ускладнюється тим, що більшість базидіомицетів володіє низькими активностями лігнінолітичних та гідролітичних ферментів, що зумовлено незбалансованістю ферментних комплексів за компонентним складом, низькою біосинтетичною активністю окремих ферментів та неоптимальними умовами самого процесу культивування (Dahia, 1983).

Недостатньо вивчені динамічні аспекти регуляції активностей даних поліферментних комплексів. Одним з найважливіших способів регуляції каталітичної активності ферментів є варіювання мікрооточення в міцелярних системах поверхнево-активних речовин (ПАР). Проте, в літературі практично відсутні дані про використання ПАР при ферментативних процесах розкладу рослинних багатокомпонентних субстратів.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було: дослідити властивості, закономірності регуляції активностей і

одержати активні препарати лігнінолітичних та гідролітичних ферментних комплексів базидіоміцетів, для чого застосовувались ПАР, препарати лігніну та різні умови культивування. Конкретно ставились завдання:

- визначити оптимальні умови ферментування та одержати активні гідролітичні та лігнінолітичні мультиферментні комплекси при твердофазній ферментації вищих базидіоміцетів на рослинних полісубстратах;
- селективно підібрати вищі базидіоміцети- активні продуценти лігнінолітичних ферментів, дослідити компонентний склад їх лігнінолітичних комплексів при різних способах ферментації та оптимальні умови культивування, що забезпечують високі рівні активностей даних ферментів;
- вивчити вплив ПАР різної іонної природи та концентрацій на лігнінолітичні ферменти грибів білої гнилі;
- одержати гомогенний препарат Mn(II)-залежної пероксидази та визначити її біохімічні характеристики.

Положення, що виносяться на захист:

- селективний вплив поверхнево-активних речовин різної іонної природи на компоненти лігнінолітичних ферментних комплексів грибів білої гнилі *Phellinus igniarius* і *Pleurotus floridae*;
- азот-залежна регуляція активностей фенолоксидаз при твердофазній ферментації грибів білої гнилі на побічних продуктах переробки олійних культур;
- індукуючий вплив препаратів лігніну (індуліну АТ та целолігніну) на лігнінолітичний ферментний комплекс гриба білої гнилі *Pleurotus floridae* та залежність активностей Mn(II)- залежної пероксидази та лаккази від розподілу високо- та низькомолекулярних фракцій в препаратах лігніну.

Наукова новизна. Вперше очищена Mn(II)-залежна пероксидаза із гриба білої гнилі *Ganoderma colossus*; визначені її біохімічні характеристики, субстратна специфічність.

Вперше в умовах твердофазної ферментації грибів білої гнилі на рослинних полісубстратах показана азот-залежна регуляція активностей фенолоксидаз.

Новизною роботи є вивчення впливу поверхнево-активних речовин різної іонної природи та концентрацій на лігнінолітичні ферментні комплекси грибів білої гнилі (*Phellinus igniarius* та *Pleurotus floridae*). Встановлено, що неіоногенні ПАР Твін-80, Твін-40 і аніонна ПАР сульфол стимулювали активності лігнінолітичних ферментів, катіонна ПАР, етоній діяла на них селективно. Знайдена більша ефективність дії ПАР стосовно підвищення активності лаккази в 1,8, а Mn(II)-залежної пероксидази - в 1,6 разів для твердофазного культивування *P. floridae* порівняно із культивуванням на синтетичному середовищі.

Теоретичне та практичне значення результатів дисертаційної роботи. Науково обгрунтовано способи одержання активних препаратів лігнінолітичних та гідролітичних ферментів грибів білої гнилі. Результати досліджень дозволяють конструювати рецептури поживних середовищ з метою регуляції активностей лігнінолітичних ферментів з різним співвідношенням компонентів в комплексі для вирішення конкретних завдань по ферментолізу природних рослинних ресурсів.

Показана можливість раціонального використання побічних продуктів переробки олійних культур (нерозчинного залишку соєвого шроту, лущиння насіння соняшнику та оболонок насіння сої) як основних компонентів поживних середовищ для твердофазного культивування дереворуйнуючих базидіоміцетів.

Оптимізовано процеси ферментування гідролітичних та лігнінолітичних ферментів при твердофазній ферментації базидіальних грибів на запропонованих поживних середовищах.

Реалізація результатів роботи. Одержані в роботі ферментні комплекси та очищений препарат Mn(II)-залежної пероксидази можуть бути застосовані в біотехнологічних препаратах для біологічної делігніфікації, вибілювання та модифікації волокон пульпи, а також в якості неспецифічних окисників при розкладі токсичних ароматичних сполук, що забруднюють оточуюче середовище (хлорфенолів, барвників, діоксину, ДДТ), для очистки стічних вод та відбілення паперу.

Особистий внесок у розробку наукових результатів, що виносяться на захист. Вивчено вплив ПАР різної ґрунтової природи, препаратів лігніну на лігнінолітичні ферменти грибів білої гнилі; очищена Mn(II)-залежна пероксидаза із *S. colossus*; оптимізовано процеси ферментування гідролаз та фенолоксидаз при твердофазній ферментації базидіоміцетів, проведено скринінг активних продуцентів фенолоксидаз, вивчено компонентний склад відселектованих штамів.

Апробація роботи. Основні результати роботи викладені на VII Int. Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (Prague, Czech Republic, 1994); VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992); Всесоюзній конференції "Проблеми культивування їстівних грибів в СРСР" (Пушино, 1991); Всесоюзній конференції "Достижения биотехнологии - агропромышленному комплексу" (Черновці, 1991); Всесоюзній конференції "Ферменти - народному хозяйству" (Черновці, 1990).

Публікації. По темі дисертації опубліковано 8 робіт.

Структура дисертації. Дисертація складається з вступу, літературного огляду (3 розділи), об'єктів і методів дослід-

жень, результатів та їх обговорення (5 розділів), рекомендацій до впровадження у виробництво, висновків, списку використаної літератури, що містить 298 посилань, поміж них 243 роботи іноземних авторів. Дисертація викладена на 165 сторінках, містить 13 таблиць, 32 малюнки.

МЕТОДОЛОГІЯ, МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРЕДМЕТУ І ОБ'ЄКТА.

Об'єктами дослідження були культури 21 виду вищих дереворуйнуючих базидіоміцетів. Основні компоненти середовищ для твердофазного культивування базидіоміцетів - нерозчинний заливочок соєвого шроту (НЗШ), оболонки насіння сої (*Glycine soja* L.) та лущиння насіння соняшнику (ЛЩ) (*Helianthus annuus* L.), отримані на Чернівецькому олійно-жировому комбінаті.

Визначення вмісту загального, білкового та небілкового азоту в субстратах проводили за методом К'ельдала. Вміст лігніну і целюлози в субстратах визначали методом титрування (Починок, 1976).

Занурене культивування базидіоміцетів проводили у середовищі Кірка (Kirk et al, 1966) з модифікаціями (Muhleim, 1991). У роботі використовували такі ПАР: аніонну ПАР сульфонову (Na- алкілбензолсульфонат), неіоногенні ПАР Твін-80 та Твін-40 (сорбітан біс(поліоксетилен) монолеати), катіонну ПАР етоній [1,2 -(N, N'-біс(діметил)-N, N'-біс(децилацетат)) етилен діамоній діхлорид] у кінцевих концентраціях у середовищі 0,1; 0,025; 0,01 та 0,001%. У роботі використовували такі препарати лігніну: комерційний препарат крафт-лігніну індулін АТ (Westvaco Corp., Charleston, CS, США), тирсу деревини сосни, целюлігнін (побічний продукт виробництва фуруролу). Гель-фільтрацію препаратів лігніну проводили на се-

фадексі G-75 (Pharmacia, Швеція) за методом Хаємерлі (Haemerli et al, 1986).

Методи визначення ферментативних активностей. Визначення протеолітичної активності проводили за модифікованим методом Ансона (ГОСТ 20264. 2-74); загальної целюлазної та загальної ксиланазної активностей – за модифікованим методом Шомоді-Нельсона (Клесов и др., 1980); ендогліканазної активності – вискозиметрично (Клесов и др., 1982). Активність лаккази визначали за окисненням о-діанізідину (Khan et al, 1990) або синрингальдазину (Harkin et al, 1973). Активність пероксидази визначали як різницю між швидкістю окислення о-діанізідину або синрингальдазину в присутності та відсутності H_2O_2 в реакційній суміші. Активність Mn(II)-залежної пероксидази (MnP) визначали за швидкістю окислення синрингальдазину (Ander et al, 1987) або 2,6-диметоксифенолу (Shuttleworth et al, 1986) в присутності та відсутності Mn^{2+} та H_2O_2 в реакційній суміші. Активності целобіозохінонооксидоредуктази (целобіозодегідрогенази, ЦБХО) та глюкозооксидази визначали за швидкістю окислення 3,5-ди-терт-бутилбензохінону в присутності відповідно целобіози (Westermark et al, 1974) або глюкози (Gomez-Alarcon et al, 1989).

Активності ферментів вимірювали за допомогою реєструючого спектрофотометру Specord M-40 (Німеччина) та CF-46. Активності ферментів виражали в міжнародних одиницях – одиниця активності відповідала кількості ферменту, необхідній для окислення 1 мкМ субстрату або утворення 1 мкМ продукту за 1 хв. на 1 л (г) ферментного препарату в оптимальних умовах. Вміст білка в ферментних препаратах вимірювали за методом Лоурі (Lowry et al, 1951).

Методи очищення ферментів. Афіну хроматографію гідролітич-

них ферментів проводили з використанням паперового пилю (Сhemarol, Чехія) в якості сорбенту. Гель-фільтрацію препаратів гідролітичних ферментів проводили на сефадексі G- 100 (Pharmacia, Швеція). Високоєфективну рідинну хроматографію МрП проводили на аніонообмінних колонках "Q-cartridge" (Bio-Rad, США) та Mono Q (H/R 5/5), (Pharmacia, Швеція). Контроль за вмістом білка здійснювали спектрофотометрично при 280 нм, МрП- 407 нм за допомогою Bio-Dimension Detector UV/VIS Monitor (Bio-Rad, США).

Субстратну специфічність МрП визначали при використанні наступних субстратів: АБТС (2,2'-азино-ді-3-етилбензотіазолін-6-сульфокислоти, Sigma, США); сирингальдазину (4-гідрокси-3,5-диметоксибензальдегідазину, Sigma, США); фенолу червоного (Sigma, США), 2,6-диметоксифенолу (Sigma, США), NADH (Boehringer, Німеччина), вератрилового (3,4-диметоксибензенового) спирту (Aldrich, США), ванілінового спирту (Aldrich, США), ваніліну (Sigma, США) та гомовератрової кислоти (3,4-диметоксифенілоцтової кислоти, Sigma, США). Активність МрП визначали спектрофотометрично за швидкістю окислення вищезазначених субстратів на початкових ділянках кінетичних кривих на різних довжинах хвиль (значення коефіцієнтів молярної екстинкції надані в табл. 4).

Електрофоретичний аналіз препаратів лігнінолітичних ферментів проводили в 10%, а також в 8-18% градієнтному ПААГ в нативних умовах за методом Девіса (Davis, 1964). Візуалізацію смуг фенолоксидаз проводили 4-хлоро-1-нафтолом (Sigma, США), (Kern, 1989). Електрофорез в денатуруючих умовах проводили за методом Лемлі (Laemmli, 1970).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. Властивості гідролітичних та лігнінолітичних мультиферментних комплексів в умовах твердофазної ферментації базидіоміцетів.

В деградації рослинних полісубстратів вирішальну роль серед гідролітичних ферментів відіграють міцно адсорбовані целюлази, а саме ендоглюканаз (Klyosov et al, 1986).

Для селективного виділення фракції ендоглюканаз продуценту гідролітичних ферментів *Bjerkandera adusta* (А/с N 38094, НРБ) застосовано афінну хроматографію на паперовому пилу. На даній стадії ступінь очистки ендоглюканаз досягав 15,7 разів при виході 30% (табл. 1). Методом SDS-електрофорезу встановлено, що афінний препарат містив 9 білкових компонентів з молекулярними масами 35-67 кДа та один - 12 кДа. На заключ-

Табл. 1 Очистка гідролітичного комплексу *B. adusta* М±п, n=5

Етап очистки	Активності (од/г білка)			
	Протеаза	Ксиланаза	Целюлаза	Ендоглюк.
Культур. екстракт	11,7±1,5	420±12,2	49,5±3,8	2,3±0,1
ПІОХ:				
осадження етанолом	7,0±0,2	612±16,4	39,6±2,7	2,1±0,1
осадження ацетоном	6,7±0,2	624±10,1	38,3±5,1	не вимір.
осадження (NH ₄) ₂ SO ₄	6,2±0,5	180±8,7	9,1±2,2	не вимір.
Афінна хроматогр.:				
вихідний препарат	2,4	570	23	2,1
фракції А.	2,3	660	24	0,83
Б	2,2	53,0	4	4,6
В	-	201	78	33,0
Гель-фільтрація:				
вихідний препарат	2,2	551,0	101,0	---
фракції I	---	164,3	28,6	---
II	---	140,0	33,3	---
III	3,5	1344,8	158,6	---
IV	6,4	574,5	251,1	---
V	---	71,1	28,9	---
VI	---	---	---	---

ному етапі очистки (концентрування компонентів гідролітичного комплексу за допомогою гель-фільтрації на сефадексі G-100) ступінь очистки досягав по: целюлазам -2,5; ксиланазам -2,4; протеазам -2,9 разів (табл. 1). Для одержання високоактивного ферментного комплексу гідролаз найбільш активні фракції об'єднували, осаджували та ліофілізували. Методом SDS-електрофорезу встановлено, що отриманий препарат містив 16 білкових компонентів з молекулярними масами від 20 до 65 кДа.

Таким чином, одержані результати дозволяють запропонувати схему послідовної очистки гідролітичного комплексу *Bjerkandera adusta*, що передбачає осадження білків із екстракту (отримання препаратів П10Х), афінне відділення фракції міцноадсорбованих ендогліканаз та концентрування гідролітичного комплексу за допомогою гель-фільтрації.

Серед лігнінолітичних ферментів ключова роль в деградації рослинних полісубстратів відводиться лігніназі та фенолоксидазам (Gold et al, 1989; Ander et al, 1977). Вивчення закономірностей регуляції активностей фенолоксидаз проводили при використанні 6 видів базидіоміцетів з різною екологічною пристосованістю. Кореляційний аналіз залежності значень ферментативних активностей від вмісту загального азоту в середовищі свідчив про існування зворотної кореляційної залежності між вмістом азоту в середовищі та величинами активностей фенолокисляючих ферментів (табл. 2). Поява активностей лігнінолітичних ферментів в умовах лімітування складу середовища за вмістом азоту відома: у випадках культивування грибів білої гнилі на синтетичних середовищах (Jeffries et al, 1981; Leisola et al, 1988). Нами в умовах твердофазного культивування грибів білої гнилі на рослинних полісубстратах показана азот-залежна регуляція активностей фенолоксидаз.

Табл. 2. Значення коефіцієнту кореляції між активностями пероксидази (ПРО), монофенолмонооксигенази (МФМ) та вмістом загального азоту в середовищі.* N=6

Bjerkandera adusta шт. 1		Pleurotus ostreatus шт. 1300		Coriolus versicolor ВКМФ 462	
ПРО -0,97	МФМ ----	ПРО -0,94	МФМ -0,83	ПРО -0,96	МФМ -0,82
Coriolus pubescens ВКМФ 115		Shizophyllum commune ВКМФ 2408		Fomes fomentarius ВКМФ 3202	
ПРО -0,90	МФМ -0,70	ПРО -0,99	МФМ -0,73	ПРО ----	МФМ -0,79

$0,01 < p < 0,05$

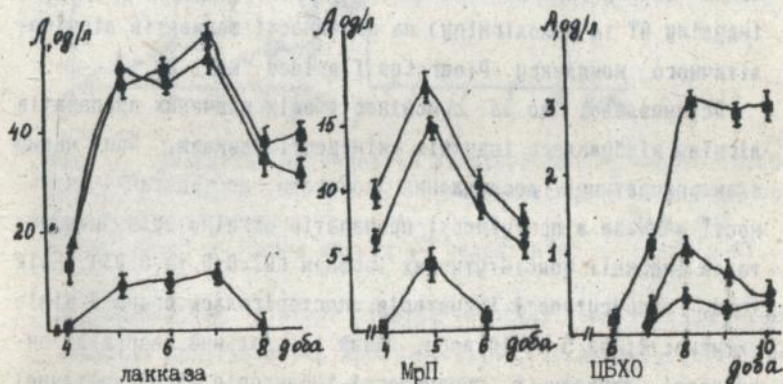
* середовище містило побічні продукти переробки олійних культур (НЗМ і ЛНС) в різних співвідношеннях.

У результаті скринінгу 37 штамів вищих базидіоміцетів, що викликають деструктивний та корозійний ксилоліз деревини, селективно відібрані штами *Phellinus igniarius*, ВКМФ 386 та *Pleurotus floridae*, ИБК 338 - активні продуценти фенолоксидаз. Подальші дослідження лігнінолітичних комплексів базидіоміцетів проводились з використанням даних селективно підібраних штамів.

Головним фактором, що визначає ступінь ферментативної конверсії лігноцеллюлозних субстратів, є рівень хімічної модифікації лігніну (Мануковский и др, 1990). Для кількісного визначення лігнін - деградаційної здатності грибів використовували коефіцієнт лігнінолітици K_l (Elisashvili et al, 1988): для *Phellinus igniarius* він дорівнював 0,34, а для *Pleurotus floridae* - 0,57.

2. Лігнінолітичні комплекси грибів білої гнилі в умовах за-
нуреного культивування.

Відомо, що для прояву активностей окремих лігнінолітичних ферментів необхідні різні фізіологічні умови (Kirk, 1978; Miheish, 1991). У зв'язку з цим вивчення компонентного складу лігнінолітичних комплексів проводили в 3 модифікованих середовищах Кірка: лімітованому за вмістом азоту, лімітованому за вмістом вуглецю та середовищі, лімітованому за вмістом обох компонентів (мал. 1). Одержані нами результати свідчили про існування зворотної кореляційної залежності між концентрацією азоту в середовищі та активністю МрП ($r=-0,91$); прямої кореляційної залежності між концентрацією азоту в середовищі та активністю ЦБХО ($r=0,99$); зворотної кореляційної залежності між концентрацією глюкози в середовищі та активністю лаккази ($r=-0,62$).



Мал. 1. Динаміка активностей лігнінолітичних ферментів при культивуванні *P. floridae* в стаціонарних умовах по Кірку.

$M \pm m, n=4$

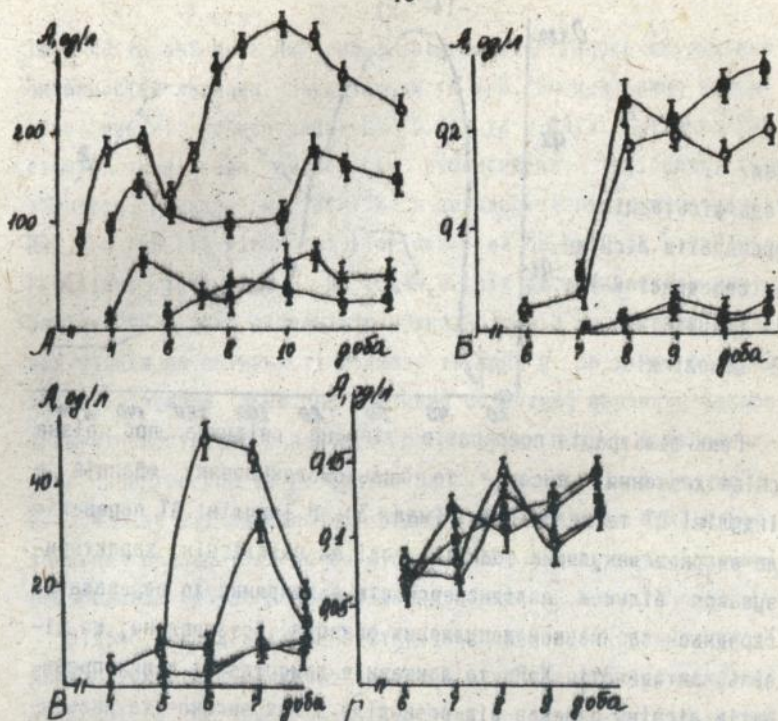
- - середовище, лімітоване за вмістом С (13 мМ С; 7,2 мМ N)
- - середовище, лімітоване за вмістом N (55 мМ С; 2,4 мМ N)
- - середовище, лімітоване за вмістом N, С (13 мМ С; 1,2 мМ N)

Застосоване нами занурене культивування *P. floridae* в умовах імобілізації мицелію на поліуретанових носіях дозволило збільшити активність лаккази в 2 рази порівняно з культивуванням в стаціонарних умовах по Кірку (мал. 2, А, контроль), а також запровадити напівперіодичний спосіб культивування. Необхідно відмітити, що недостатня аерація в товстому шарі середовища порівняно з культивуванням у середовищі Кірка з високим вмістом молекулярного кисню обумовлювала відсутність активності МрП (мал. 2, В, контроль).

3. Індукція лігнінолітичної системи *Pleurotus floridae*.

Грунтуючись на повідомленнях про здатність препаратів лігніну індукувати лігнінолітичні ферменти (Leisola et al, 1989; Ulmer et al, 1984) нами проведено дослідження по вивченню впливу препаратів лігніну (тирси деревини сосни, індуліну АТ та целолігніну) на активності ферментів лігнінолітичного комплексу *Pleurotus floridae* (мал. 2).

Встановлено, що в присутності всіх вивчених препаратів лігніну відбувалась індукція активності лаккази. При цьому електрофоретичні дослідження показали, що зростання активності лаккази в присутності препаратів лігніну було результатом індукції конститутивних ізоформ ($R_f=0,6$ та $0,63$). Крім того, в присутності індукторів спостерігалась поява 2 піків активності: на 5 та 10 добу. Даний бімодальний розподіл активності лаккази в присутності індукторів лігнінолітичної системи пов'язується з явищами непрямої фенольної індукції внаслідок існування лакказо-целобіозо-хінон-оксидоредуктазного та лакказо-глюкозо-хінон-оксидоредуктазного циклів (Gomez-Alarcon et al, 1987; Westermark et al, 1974). Якщо в контрольних препаратах, що не містили препаратів лігніну та



Мал. 2. Динаміка активностей лігнінолітичних ферментів (А-лаккази, Б- ЦБХО, В- МрП, Г- глюкозооксидази) в присутності препаратів лігніну. $M \pm m, n=4$

●- контроль; x- тирса сосни; ■- целолігнін; o- індулін АТ.

препаратах, що містили тирсу, спостерігалась незначна активність МрП (ізоформа МрП1, $Rf=0,14$), то в присутності целолігніну та індуліну АТ відбувалась індукція ізоформи МрП2 ($Rf=0,41$). В присутності целолігніну та індуліну АТ відбувалась також індукція активності ЦБХО. Присутність препаратів лігніну не впливала на активність глюкозооксидази (мал. 2).

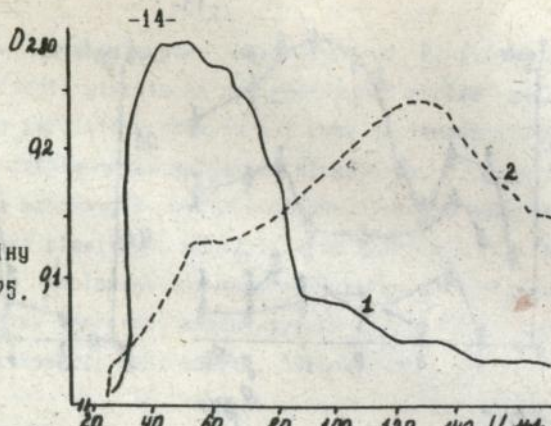
Таким чином, встановлено селективний вплив досліджених препаратів лігніну на лігнінолітичний комплекс *P. floridiae*.

Мал. 3.

Гель-фільтрація
препаратів лігніну
на сефадексі G-75.

1- індулін АТ;

2- целолігнін.



Гель-фільтрація препаратів лігніну свідчила про різне співвідношення високо- та низькомолекулярних фракцій в індуліні АТ та целолігніні (мал. 3). В індуліні АТ переважала високомолекулярна фракція, тоді як целолігнін характеризувався більшою полідисперсністю в напрямку до переважання середньо- та низькомолекулярних фракцій. Встановлено, що рівень активності МрП та лаккази в присутності даних препаратів лігніну залежав від розподілу в них високо- та низькомолекулярних фракцій та був більший в присутності індуліну АТ, де вміст високомолекулярних фракцій вищий.

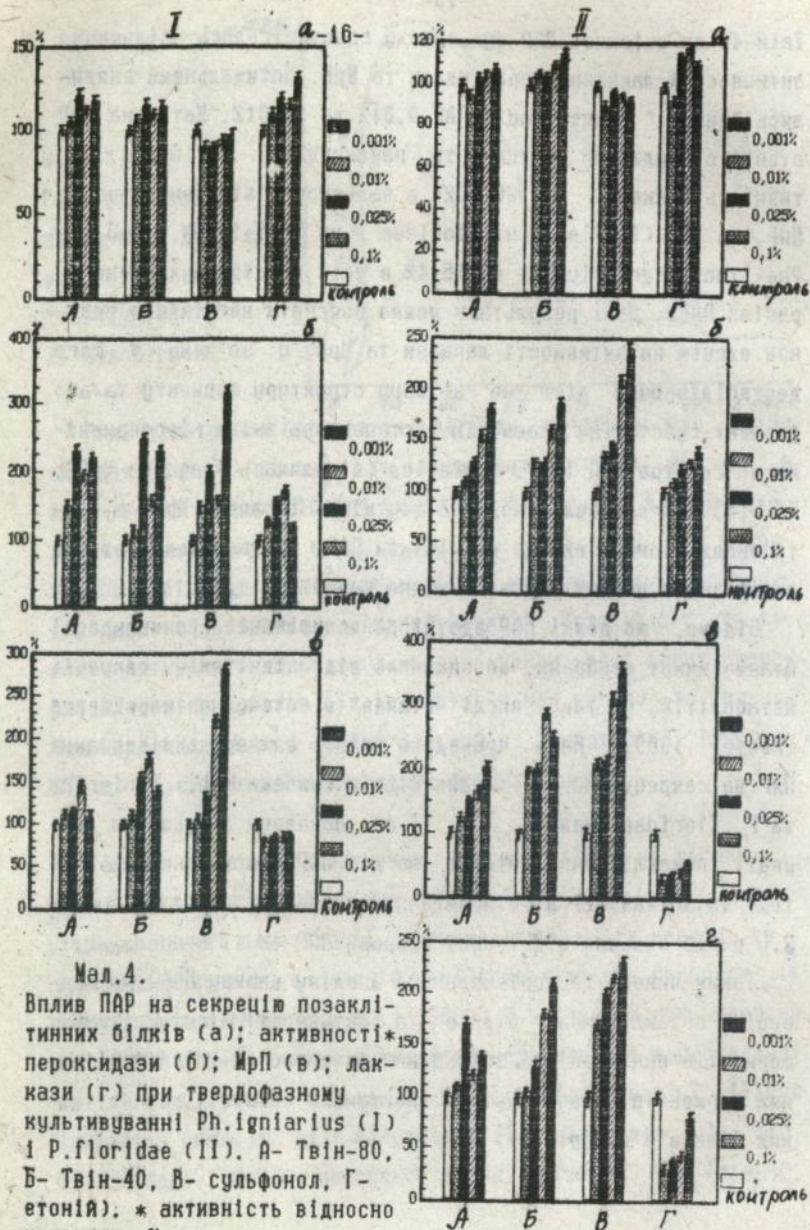
4. Вплив поверхнево-активних речовин (ПАР) на лігнінолітичні комплекси грибів білої гнилі:

Каталітичні властивості лігнінолітичних ферментів, що є мембраноактивними, в значній мірі визначаються природою їх мікрооточення (Клячко и др., 1988). У зв'язку з цим вивчено вплив ПАР різної іонної природи та концентрацій в середовищі на лігнінолітичні комплекси грибів білої гнилі *Phellinus igniarius* (мал. 4, I) і *Pleurotus floridae* (мал. 4, II). Встановлено, що в присутності неіоногенних ПАР Твін-80,

Твін-40 та аніонної ПАР сульфонолу спостерігалось збільшення активностей лаккази, пероксидази та МрП. Оптимальними виявились "низькі" концентрації ПАР 0,01% та 0,001%. Катіонна ПАР етоній стимулювала активність пероксидази, інгібуючи активність лаккази на 20-70% в залежності від концентрації ПАР, та МрП (із *Pleurotus floridae* - на $58,8 \pm 10,3\%$, МрП із *Phellinus igniarius* - на $15,4\%$ в усіх досліджених концентраціях ПАР). Дані результати можна пояснити негативним впливом етонію на активності лаккази та МрП у зв'язку з його дестабілізуючою дією на нативну структуру ферменту та/або фермент-субстратну взаємодію. Встановлена зміна ізоферментного спектра МрП із *P. igniarius* (з'являлась ізоформа МрП2, $Rf=0,43$) за дії сульфонолу. Відсутність ізоформи МрП2 в контрольних препаратах (що не містили ПАР) підтверджено електрофорезом в умовах переважання гелей.

Відомо, що деякі ПАР здатні до модифікації проникливості плазматичної мембрани, що викликає відповідні зміни секреції метаболітів, у тому числі білків в оточуюче середовище (Reese, 1969). Нами проведено аналіз впливу досліджуваних ПАР на секрецію позаклітинних білків грибами *Ph. igniarius* та *P. floridae* (мал. 4, I-a, II-a). Показано збільшення секреції позаклітинних білків за дії ПАР максимально на 35%, тоді як активності лігнінолітичних ферментів зростали в 0,3-3,6 разів залежно від іонної природи ПАР та її концентрації.

Таким чином, із порівняльного аналізу впливу ПАР на секрецію позаклітинних білків та активності лігнінолітичних ферментів випливає, що збільшення активностей лігнінолітичних ферментів не обмежується зростанням секреції позаклітинних білків в присутності ПАР.



Мал. 4.
Вплив ПАР на секрецію позаклітинних білків (а); активності* пероксидази (б); МрП (в); лаккази (г) при твердофазному культивуванні *Ph. igniarius* (I) і *P. floridiae* (II). А- Твін-80, Б- Твін-40, В- сульфол, Г- етоній). * активність відносно контролю, %.



Мал. 5.

Вплив ПАР на активності* лаккази (а); пероксидази (б); МрП (в) при культивуванні *P. floridae* на синтетичному середовищі. А- Твін-80, Б-Твін 40, В- сульфенол, Г- етоній. *активність відносно контролю, %.

ПАР мають здатність сольбілізувати субстрати, що призводить до переходу раніше нерозчинних сполук у розчин (Hiroshi et al, 1986). З метою оцінки ролі сольбілізації рослинного полісубстрату в сумарній зміні ферментативних активностей в присутності ПАР нами вивчено вплив ПАР на лігнінолітичний комплекс при культивуванні *P. floridae* на синтетичному середовищі (мал. 5). Проведено порівняльний аналіз відносної зміни ферментативних активностей *P. floridae* під впливом ПАР при двох методах культивування. Встановлено, що в присутності досліджуваних неіоногенних та аніонної ПАР активність МрП при твердофазному культивуванні порівняно із культивуванням на синтетичному середовищі в середньому зростала в 1,6 разів, в присутності неіоногенних ПАР Твін-80 та Твін-40 активність лаккази зростала в 1,35-1,63 разів, аніонна ПАР

сульфонол у всіх досліджених концентраціях викликала однако-
ве (в $1,86 \pm 0,14$ разів) зростання активності лаккази при
твердофазному культивуванні порівняно з культивуванням на
синтетичному середовищі. Зростання активностей ферментів в
присутності ПАР при твердофазному способі культивування
порівняно з культивуванням на синтетичному середовищі,
імовірно, пояснюється як солюбілізацією субстрату, що приво-
дить до розкладу раніше недоступних для дії ферменту струк-
тур субстрату, так і викликаним ПАР прискоренням десорбції
адсорбованих лігнінолітичних ферментів з поверхні субстрату,
що сприяє їх вступу в новий каталітичний цикл (Измайлова и
др, 1988). Солюбілізація субстрату не впливала на зміну ак-
тивності пероксидази при двох методах культивування в при-
сутності ПАР.

Отримані результати свідчать про активацію лігнінолітич-
них ферментів в присутності досліджених неіоногенних та
аніонної ПАР, селективну регуляцію активностей лігнінолітич-
них ферментів катіонною ПАР етонієм, а також підкреслюють
важливість наявності навколо ферменту специфічно діючого на
нього міцелярного мікрооточення та можливість регуляції ак-
тивності ферменту шляхом варіювання даного мікрооточення.

5. Очистка та характеристика Mn^{2+} -залежної пероксидази із
гриба білої гнилі *Ganoderma colossum*.

Вважають, що ключовим ферментом в лігнінолітичних комп-
лексах, в яких відсутня лігніназа, є $Mn(II)$ -залежна перокси-
даза (Леонтьевский и др, 1990).

На першій стадії очистки MnP із лігнінолітичної культури
гриба *G. colossum* використана вискоефективна рідинна хрома-
тографія (HPLC) на аніонообмінній колонці "Q- cartridg.",

завдяки чому вдалося відділити пігменти та лакказу, вихід МрП склав 39,1% за активністю (табл. 3). Наступна стадія очистки, призначена для більш тонкого розділення препарату МрП, включала швидку білкову рідинну хроматографію (FPLC) на сильному аніонообміннику Mono Q (HR 5/5). Остаточню 27% вихідної активності було одержано як чистий фермент (табл. 3). SDS - електрофорез свідчив про гомогенність ферменту, який мав молекулярну масу 47 кДа. Ізоелектрична точка ферменту дорівнювала 3,0.

Табл. 3.

Схема очистки Mn²⁺-залежної пероксидази із *Ganoderma colossus* *

Етап очистки	Об'єм, мл	Акт., од/л	Акт., од	Вихід, %
Культуральний екстракт	900	258	232,2	100
Ультрафільтрація, Amicon, PM-10 (10 кДа)	1,8	85500	153	65,9
Іонообмінна хроматогр. Q-cartridge (Bio-Rad)	1,5	80467	90,7	39,1
Диультрафільтрація, Amicon, PM-30 (30 кДа)	0,1	798000	71,8	30,9
Іонообмінна хроматогр., Mono Q (Pharmacia)	0,08	791250	63,3	27,3

* активність МрП вимірювали по окисленню 2,6-диметоксифенолу

Дослідження субстратної специфічності МрП проводили на типових субстратах МрП, лаккази та лігнінази (табл. 4). Фермент проявляв абсолютну залежність від Mn²⁺, як і всі виділені раніше МрП із лігнінолітичних культур грибів білої гнилі (Johansson et al, 1987; Forrester et al, 1990). МрП окислювала фенол червоний, АБТС, сирингальдазин, 2,6-диметоксифенол лише в присутності H₂O₂, що підтверджує пероксидазну природу ферменту. H₂O₂ - не вимагався як ко-субстрат

при окисленні NADH. В даній реакції проявляються оксидазна та H_2O_2 -генеруюча властивості ферменту (Беккер, 1993). Гомовератрова кислота, вератриловий та ваніліновий спирти (типові субстрати лігнінази) не окислювались Mn(II)-залежною пероксидазою.

Табл. 4 Субстратна специфічність Mn²⁺-залежної пероксидази із *Ganoderma colossus*. $M_{\pm m}$, n=5

субстрат	λ , нм	ϵ , М см ⁻¹	ΔA хв ⁻¹ л ⁻¹ відн. од	Активність, мМ хв ⁻¹ л ⁻¹
АБТС	420	36000	58,5±2,5	12975±549
сирингальдазин	525	65000	83,2±1,6	10233±190
фенол червоний *	610	невідом	13,9±0,1	-----
2,6-диметоксифенол	470	10500	48,2±0,1	38560±20
NADH	340	6220	90,3±4,2	119900±5270
вератриловий спирт	310	9300	-----	-----
ваніліновий спирт	310	9300	-----	-----
гомовератрова кислота	310	9300	-----	-----

Реакційна суміш (0,8 мл) містила 0,2 мМ $MnSO_4$, 0,1 мМ субстрат, 50 мМ Na-лактатний буфер, рН4,7 та 0,1 мл MnP. Реакцію починали додаванням 1 мМ H_2O_2 та проводили при 20°C на зазначених в таблиці довжинах хвиль.

* реакцію припиняли через 5 хв додаванням 5 μ л 5н NaOH (Glenn et al, 1985).

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ І ВИСНОВКИ.

1. Одержані активні мультиферментні комплекси гідролітичних та лігнінолітичних ферментів та визначені оптимальні умови ферментування при твердофазній ферментації вищих базидіальних грибів на рослинних полісубстратах.
2. Вперше в умовах твердофазної ферментації грибів білої гнилі на лігноцелюлозних полісубстратах показана азот-залежна регуляція активностей фенолоксидаз.
3. У результаті скринінгу 37 штамів вищих базидіоміцетів селективно відібрані штами *Phellinus igniarius*, ВКМФ 386 та *Pleurotus floridae*, ИБК 338, яким властиві високі активності фенолоксидаз; визначений компонентний склад їх лігнінолітичних ферментних комплексів при різних способах культивування та ступінь деградації рослинного полісубстрату.
4. Встановлено індукуючий вплив препаратів лігніну (індуліну АТ і целолігніну) на лігнінолітичний ферментний комплекс *Pleurotus floridae*. При цьому рівні активностей $Mn(II)$ -залежної пероксидази та лаккази залежали від розподілу високої та низькомолекулярних фракцій в препаратах лігніну.
5. Вперше вивчено вплив поверхнево-активних речовин (ПАР) різної іонної природи та концентрацій в середовищі на активності лігнінолітичних ферментів грибів білої гнилі (*Phellinus igniarius* та *Pleurotus floridae*). Встановлено, що неіоногенні ПАР Твін-80, Твін-40 і аніонна ПАР сульфол стимулювали активності лігнінолітичних ферментів, катіонна ПАР етоній діяла на них селективно. Показано збільшення секреції позаклітинних білків за дії ПАР максимально на 35%, і активностей лігнінолітичних ферментів - в 0,3- 3,6 разів залежно від іонної природи ПАР та її концентрації. Виявлено вплив сульфонолу на ізоферментний спектр $Mn(II)$ -залежної пе-

роксидази із *Phellinus igniarius*.

6. Знайдена більша ефективність дії ПАР стосовно підвищення активності лаккази в 1,8, а Mn(II)-залежної пероксидази - в 1,6 разів для твердофазного культивування *Pleurotus floridae* порівняно із культивуванням на синтетичному середовищі, що не підтверджено для пероксидази.

7. Вперше очищена Mn(II)-залежна пероксидаза із гриба *Ganoderma colossus*; визначені її біохімічні характеристики, субстратна специфічність.

8. Показана можливість раціонального використання побічних продуктів переробки олійних культур (нерозчинного залишку соєвого шроту, лущиння насіння соняшнику та оболонки насіння сої) в якості основних компонентів поживних середовищ для твердофазного культивування дереворуйнівних базидіоміцетів.

СПИСОК РОБІТ, НАДРУКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. Мошкович Ф.С., Костышин С.С., Домбровская Е.Н., Копыльчук Г.П., Мурадов П.З., Ганбаров Х.Г. Получение и характеристика гидролаз базидиомицета *Vjerkandera adusta*. I. Оптимизация ферментообразования. // Биотехнология. - 1991. - № 6. - с.44-46.
2. Копыльчук Г.П., Костышин С.С., Мошкович Ф.С., Горичан У.П., Домбровская Е.Н. Получение и характеристика гидролаз базидиомицета *Vjerkandera adusta*. II. Очистка ферментного комплекса. // Биотехнология. - 1992. - № 2. - с.16-18.
3. Костышин С.С., Мошкович Ф.С., Домбровская Е.Н., Оплачко Л.Т. Фенолоксидазные активности некоторых высших базидиомицетов. I. Оптимизация ферментообразования и скрининг продуцентов. // Биотехнология. - 1992. - № 6. - с.46-49.

4. Копыльчук Г.П., Ганбаров Х.Г., Мурадов П.З., Пендерецкая У.П., Момкович Ф.С., Домбровская Е.Н. Биосинтез и компонентный состав гидролаз дереворазрушающих грибов *Veterkan-dera adusta*.// Труды Всес. научно-практ. конф. "Ферменты-народному хозяйству", Черновцы, 1990.- 1990.- с.74.
5. Осовик А.Н., Костишин С.С., Момкович Ф.С., Домбровская Е.Н., Лупашко В.А., Дербина И.И. Культивирование *Pleurotus ostreatus* на отходах переработки масличных культур.// Сб.тез. III Всес. сов. "Проблемы культивирования съедобных грибов в СССР, Пушино-на-Оке, 1991.- 1991.- с.37.
6. Домбровская Е.Н., Момкович Ф.С., Оплачко Л.Т. Оптимизация ферментообразования пероксидаз и фенолоксигеназ базидиомицетами.// Труды Всес. конф. "Достижения биотехнологии-агропромышленному комплексу", Черновцы, 1991.- 1991.- с.127.
7. Домбровська О.М., Оплачко Л.Т., Момкович Ф.С. Ізоферментний склад пероксидаз і монофенолмонооксигеназ вищих дереворуйнуючих грибів.// Тези допов. VI Укр. біохімічного з'їзду, Київ, 1992.- 1992.- т.3, с. 79.
8. Dombrowskaya H., Horvath E.-M., Kostyshyn S.S., Messner K. Manganese peroxidase from the ligninolytic basidiomycete *Ganoderma colossum*: purification and characterization.// Proc. 7-th Int. IUMS Congress, Prague, July 3-8, 1994.- 1994.- V.2- p. MS14.

Домбровская Е.Н. Свойства лигнинолитических и гидролитических мультиферментных систем дереворазрушающих базидиомицетов.

Рукопись диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - "Биохимия", Черновицкий госуниверситет, г. Черновцы, 1994.

Защищено 8 научных работ, содержащих исследования лигнинолитических и гидролитических мультиферментных комплексов при твердофазной и погруженной ферментации дереворазрушающих базидиомицетов. Впервые очищена Mn(II)-зависимая пероксидаза из гриба белой гнили *Ganoderma colossus*; определены ее биохимические характеристики, субстратная специфичность. Установлено, что поверхностно-активные вещества различной ионной природы селективно влияют на лигнинолитические ферментные комплексы избранных отобранных грибов белой гнили (*Phellinus igniarius* и *Pleurotus floridae*). Показана большая эффективность действия ПАВ относительно повышения активности лакказы в 1,8, а Mn-зависимой пероксидазы - в 1,6 раз для твердофазного культивирования *Pleurotus floridae* по сравнению с культивированием на синтетической среде, что не подтверждено для пероксидазы. В условиях твердофазной ферментации грибов белой гнили на лигноцеллюлозных полисубстратах показана азот-зависимая регуляция активностей фенолоксидаз.

Helen N. Dombrovskaya Properties of ligninolytic and hydrolytic multienzyme systems of wood-rotting fungi.

A dissertation submitted for the degree of Candidate of Biological Sciences, specialization 03.00.04 - Biochemistry, Chernovtsy State University, Chernovtsy, 1994.

8 scientific publications are defended, containing the research of ligninolytic and hydrolytic multienzyme complexes under solid-state and submerged fermentation of wood-rotting fungi. For the first time the Mn(II)-dependent peroxidase from the white-rot fungus *Ganoderma colossus* has been purified; its biochemical properties and substrate specificity have been determined. The selective influence of different ionic nature surfactants on ligninolytic enzyme complexes of selected white-rot fungi (*Phellinus igniarius* and *Pleurotus floridae*) has been shown. Higher efficiency of surfactants' influence in relation to increasing activity of laccase by 1.8 times; Mn-dependent peroxidase - by 1.6 times during solid-state fermentation comparing to *Pleurotus floridae* cultivation on synthetic medium has been shown, which has not been proved for peroxidase activity. Nitrogen-dependent regulation of phenoloxidase activities during solid-state fermentation of white-rot fungi on by-products of oil-bearing crops processing has been shown.

Ключові слова: гриби білої гнилі, лігнинолітичні ферменти, лакказа, Mn(II)-залежна пероксидаза, монофенолмоноксигеназа, целобіозохінонооксидоредуктаза, побічні продукти переробки олійних культур, біодеградація, скринінг продуктів, препарати лігніну, індукція, поверхнево-активні речовини, імобілізація міцелію, гідролітичні ферменти.

Підписано до друку 18.11.94.
Формат 60x84/16. Папір друкарський.
Друк офсетний. Ум. друк. арк. 1,3.
Обл.- вид. арк. 1,4. Тираж 100.
Зам. 100

Друкарня видавництва "Рута" Чернівецького держуніверситету
274012, Чернівці, вул. Коцюбинського, 2

AB 31.435

AB 31.435