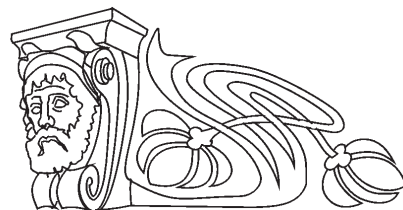




УДК 579.222.2

УЧАСТИЕ ЛАККАЗЫ ГРИБА *STROPHARIA RUGOSOANNULATA* DSM 11372 В ДЕГРАДАЦИИ ПАУ

С. А. Баландина, Н. Н. Позднякова, О. В. Турковская



Баландина Светлана Андреевна, магистрант кафедры биохимии и биофизики биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского; лаборант лаборатории экологической биотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов). E-mail: sveta.balandin@mail.ru

Позднякова Наталия Николаевна, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической биотехнологии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов), доктор биологических наук. E-mail: pozdnyakova_n@ibppm.ru

Турковская Ольга Викторовна, заведующая лабораторией экологической биотехнологии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов), профессор, доктор биологических наук. E-mail: turkovskaya_o@ibppm.ru

Почвообитающие лигнинолитические базидиомицеты, такие как *Stropharia rugosoannulata*, играют важную роль в трансформации и деградации органического вещества почвы, в том числе поллютантов. Информации о механизмах деградации ксенобиотиков подобными грибами и роли их лигнинолитической ферментной системы все еще недостаточно. Нами выявлена способность *S. rugosoannulata* деградировать четырехкольцевые полициклические ароматические углеводороды (пирен, флуорантен). Флуорен и 2-карбоксібензальдегид идентифицированы как продукты деградации этих веществ. Очищена и охарактеризована лакказа *S. rugosoannulata*. По основным каталитическим свойствам этот фермент подобен большинству известных грибных лакказ. Лакказа *S. rugosoannulata* окисляла 2,7-диаминофлуорен, как модель ПАУ, что позволяет предположить ее участие в начальной атаке молекул ПАУ.
Ключевые слова: лигнинолитические грибы, деградация, лакказа, полициклические ароматические углеводороды.

DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-3-331-332

Введение

Грибы, разрушающие в природе лигниновый компонент древесины, способны метаболизировать и минерализовать широкий спектр устойчивых ароматических соединений, включая полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Это уникальное свойство связано с продукцией грибами внеклеточной, неспецифической, окислительной ферментной системы, включающей лакказу и Mn-пероксидазу. Почвообитающие базидиомицеты, такие как *Stropharia rugosoannulata*, играют важную роль в трансформации органического вещества почвы, в том числе в разрушении поллютантов. Сведений о механизмах деградации этими грибами ксенобиотиков и участии их лиг-

нинолитических ферментов все еще недостаточно.

Целью представленной работы было изучение каталитических свойств и участия лакказы в деградации ПАУ грибом *Stropharia rugosoannulata* DSM 11372. Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**: изучение деградативной активности гриба по отношению к ПАУ; подбор условий его культивирования для получения максимальной продукции лакказы; разработка схемы очистки и получение лакказы; характеристика лакказы и выявление ее активности по отношению к ПАУ.

Материалы и методы

Изучение деградативной активности гриба проводили в условиях погруженного культивирования по описанной нами ранее методике (Позднякова и др., 2016). Оценку убыли ПАУ и выявление метаболитов при их деградации проводили методом ГЖХ в Центре коллективного пользования «Симбиоз» ИБФРМ РАН. Для получения лакказы гриб культивировали на среде Bioclean с 2 мМ феруловой кислотой и 50 мМ CuSO₄ в качестве индукторов. Схема очистки фермента включала фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрацию на Sephacryl S200, ионообменную хроматографию на DEAE-Toyopearl. Чистоту фермента контролировали электрофорезом в денатурирующих условиях. Активность ферментов и каталитические свойства лакказы определяли спектрофотометрическими методами (Leonowicz and Crzywnowicz, 1981; Niku-Paavola et al., 1988; Martinez et al., 1996; Criquet et al., 2000).

Результаты и их обсуждение

Убыль пирена и флуорантена из среды культивирования гриба *S. rugosoannulata* составила 86 и 87% соответственно. В качестве мажорного метаболита был выявлен 2-карбоксібензальдегид, что указывает на расщепление ароматических колец в молекулах ПАУ. Также был выявлен метаболит деградации флуорантена, сохраняющий трехкольцевую структуру флуорена. Деградация обоих исследованных ПАУ сопровождалась продукцией лакказы и Mn-пероксидазы, которая начиналась почти одновременно, достигая 16 и 2,4 Ед./мл на 10–12-е сутки.



Известно, что лигнинолитические ферменты могут катализировать ключевые этапы деградации ароматических веществ. Активность Mn-пероксидазы была невысокой, поэтому нами выделена и частично охарактеризована по основным молекулярным и каталитическим свойствам только внеклеточная лакказа гриба *S. rugosoannulata*. Для получения грубого ферментного препарата гриб культивировали до достижения максимума продукции лакказы. Разработанная нами схема позволила получить лакказу высокой степени очистки, которую далее использовали в экспериментах. Это мономерный белок с молекулярной массой 72 кДа. Лакказа была термостабильной и сохраняла до 24% при 60°C в течение суток. Это может быть результатом гликозилирования белка. Определены оптимумы pH и каталитические константы окисления основных субстратов. Наибольшим сродством фермент обладал к синингалдазину, который считают тестовым для подобных ферментов. Максимальная скорость реакции лакказы была обнаружена с АБТС, для этого же субстрата показано наибольшее число оборотов. Исследована активность лакказы по отношению к модельному соединению ПАУ – 2,7-диаминофлуорену. Показано высокое сродство фермента к этому субстрату, о чем свидетельствует низкая величина K_M , находящаяся в одном ряду с таковой тестового субстрата лакказы.

Заключение

Таким образом, исследована деградативная активность почвообитающего базидиомицета *S. rugosoannulata* по отношению к четырехциклическим ПАУ. Впервые выявлены, как продукты деградации флуорантена и пирена, 2-карбоксібензальдегид и метаболит с трехкольцевой структурой флуорена. Выделенная и охарактеризованная нами лакказа *S. rugosoannulata* по основным каталитическим свойствам подобна известным грибным лакказам (Shraddha *et al.*, 2011). На примере 2,7-диаминофлуорена показана принципиальная возможность лакказы окислять ПАУ.

Образец для цитирования:

Баландина С. А., Позднякова Н. Н., Турковская О. В. Участие лакказы гриба *Stropharia rugosoannulata* DSM 11372 в деградации ПАУ // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2017. Т. 17, вып. 3. С. 331–332. DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-3-331-332.

Cite this article as:

Balandina S. A., Pozdnyakova N. N., Turkovskaya O. V. The Involvement of Laccase of the Fungus *Stropharia Rugosoannulata* DSM 11372 in PAH Degradation. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser: Chemistry. Biology. Ecology*, 2017, vol. 17, iss. 3, pp. 331–332 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-3-331-332.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-00351).

Авторы благодарят д-ра Д. Шлоссера (Центр исследований окружающей среды, Лейпциг, Германия) за предоставление штамма, а также кандидата биологических наук М. П. Чернышова за проведение газожидкостной хроматографии.

The Involvement of Laccase of the Fungus *Stropharia Rugosoannulata* DSM 11372 in PAH Degradation

S. A. Balandina, N. N. Pozdnyakova, O. V. Turkovskaya

Svetlana A. Balandina, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, sveta.balandinp@mail.ru

Nataliya N. Pozdnyakova, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, pozdnyakova_n@ibppm.ru

Olga V. Turkovskaya, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, turkovskaya_o@ibppm.ru

Soil-inhabiting ligninolytic basidiomycetes, such as *Stropharia rugosoannulata*, play an important role in the transformation of soil organic matter, including the degradation of pollutants. Information on the mechanisms of degradation of xenobiotics by these fungi and their ligninolytic enzymes is still limited. The degradative activity of the soil-inhabiting basidiomycete *S. rugosoannulata* towards four-rings PAHs was revealed. Fluorene and 2-carboxybenzaldehyde have been identified as products of degradation of fluoranthene and pyrene. The laccase of *S. rugosoannulata* was isolated and characterized; its main catalytic properties are similar to that of well-known fungal laccases. The laccase catalyzed oxidation of 2,7-diaminofluorene as model of PAHs that propose the participation of this enzyme in the initial attack of molecules of PAHs.

Key words: ligninolytic fungi, degradation, laccase, polycyclic aromatic hydrocarbons.

Acknowledgements: This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 16-04-00351).