

С. В. Киселева (асп.), Э. Р. Насибуллина (студ.),
Л. Х. Халимова (к.т.н., доц.), Н. И. Петухова (к.б.н., доц.)

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДА НА ПРОДУКЦИЮ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ФЕНОЛОКСИДАЗНЫХ ФЕРМЕНТОВ БАЗИДИОМИЦЕТОМ *FOMES FOMENTARIUS* Э-14

Уфимский государственный нефтяной технический университет,
кафедра биохимии и технологии микробиологических производств
450064, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1; e-mail: kiselevabtmp@gmail.com

S. V. Kiseleva, E. R. Nasibullina, L. Kh. Khalimova, N. I. Petukhova

THE INFLUENCE OF DIFFERENT CARBON SOURCES ON EXTRACELLULAR PHENOL OXIDASES PRODUCTION BY BASIDIOMYCETE *FOMES FOMENTARIUS* E-14

Ufa State Petroleum Technological University
1, Kosmonavtov Str., 450064, Ufa, Russia; e-mail: kiselevabtmp@gmail.com

Изучено влияние источников углерода (глюкозы, сахарозы, кукурузного и картофельного крахмала, пшеничной и льняной муки, пшеничных и овсяных отрубей) на фенолоксидазную активность внеклеточных ферментов *F. fomentarius* Э-14 в условиях поверхностного культивирования гриба на жидких средах. Обнаружено, что наибольшая фенолоксидазная активность культуральной жидкости достигается при использовании льняной муки в качестве источника углерода. Показано, что ферменты культуральной жидкости, полученной на среде с льняной мукой, способны осуществлять деградацию синтетических красителей (бромтимолового синего, ремазола, индигокармина, ксиленового оранжевого).

Ключевые слова: *Fomes fomentarius*; базидиомицеты; деградация; лакказы; синтетические красители; фенолоксидазная активность.

The influence of different sources of carbon (glucose, sucrose, corn and potato starch, wheat and linen flour, wheat and oat bran) on the extracellular phenol oxidase activity of fungus *F. fomentarius* E-14 cultivated by liquid-state fermentation was studied. The highest phenol oxidase activity of the cultural broth was observed on the medium with linen flour as the carbon source. It is shown that the enzymes of the cultural broth obtained from the medium with linen flour are able to oxidize synthetic dyes (bromothymol blue, remazol, indigo carmine, xylenol orange).

Key words: basidiomycetes; degradation; *Fomes fomentarius*; laccase; phenol oxidase activity; synthetic dyes.

Работа была поддержана «Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» (Фонд содействия инновациям) в рамках работы по конкурсу «УМНИК-2020» (дог. №16276ГУ/2021 от 18.05.2021 г.).

This work was supported by the Fund for Assistance to the Development of Small Forms of Enterprises in the Scientific and Technical Sphere (Fund for Assistance to Innovation) within the framework of the UMNIC-2020 competition (contract No.16276GU/2021 dated May 18, 2021).

Дата поступления 14.09.21

Многие синтетические красители, применяющиеся в промышленности, представляют собой производные полиароматических соединений, токсичные для живых организмов. Такие красители трудно разлагаются в природных условиях, в связи с чем возникает серьезная проблема очистки сточных вод промышленных предприятий, производящих или использующих данные соединения ¹.

Перспективным подходом для решения данной проблемы является использование для деградации синтетических красителей фенолоксидазных ферментов (лакказы, пероксидаза, марганец-пероксидаза), продуцируемых некоторыми базидиальными грибами (*Trametes versicolor*, *T. pubescens*, *T. trogii*, *Coprinus comatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Lentinus polychrous*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius*, *Marasmiellus palmivorus*, *Fomes fomentarius* и др.) ^{1–7}. Фенолоксидазы грибов катализируют начальные реакции деградации красителей в присутствии окислителя (кислорода или перекиси водорода), что приводит к обесцвечиванию сточных вод и облегчает их дальнейшую биологическую очистку ^{1–5}.

В настоящей работе с целью разработки эффективной среды для получения внеклеточных фенолоксидазных ферментов гриба *F. fomentarius* Э-14, способных деградировать синтетические красители, осуществлен поиск перспективного источника углерода для культивирования продуцента.

Поиск источника углерода осуществляли в процессе поверхностного культивирования гриба *F. fomentarius* Э-14 на жидких средах в стационарных условиях при 22 °С. В качестве контрольного варианта использовали глюкозо-пептонную среду, рекомендованную для синтеза фенолоксидазных ферментов базидиомицетами, содержащую 2% глюкозы ^{8–10}. В экспериментах с альтернативными источниками углерода глюкозу заменяли сахарозой, крахмалом (кукурузным и картофельным), мукой (пшеничной и льняной) или отрубями (пшеничными и овсяными). О синтезе внеклеточных фенолоксидазных ферментов в процессе культивирования судили по уровню окислительной активности культуральной жидкости в реакции окисления пирокатехина ^{11–13}.

В результате исследования динамики фенолоксидазной активности культуральной жидкости в процессе культивирования гриба на контрольной среде с 2% глюкозы было установлено, что она достигает максимального значения 14–15 ед./мл на 11–15-е сутки (рис. 1).

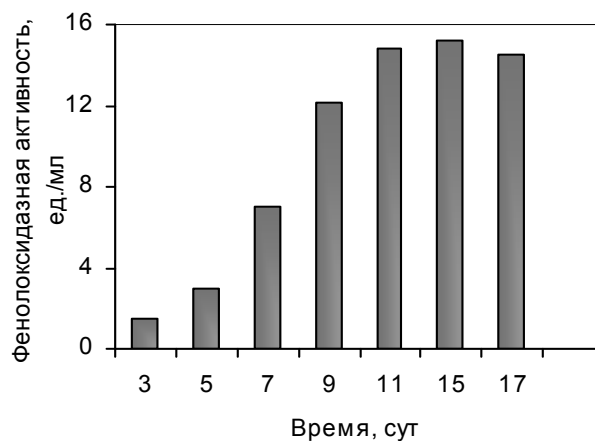


Рис. 1. Динамика фенолоксидазной активности культуральной жидкости в процессе поверхностного культивирования гриба *F. fomentarius* Э-14 на среде, содержащей 2% глюкозы (контрольный вариант)

Сравнение результатов окисления пирокатехина образцами 11-ти суточной культуральной жидкости, полученными на средах с сахарозой, кукурузным и картофельным крахмалом, с контрольным вариантом, показало, что замена глюкозы другими углеводами в той же концентрации (2 %) не приводит к увеличению окислительной активности внеклеточных фенолоксидаз (рис. 2). Уровень фенолоксидазной активности культуральной жидкости, достигнутый на среде с сахарозой, был сопоставим с контрольным значением, а в случае крахмалосодержащих сред он был ниже на 10–15 %.

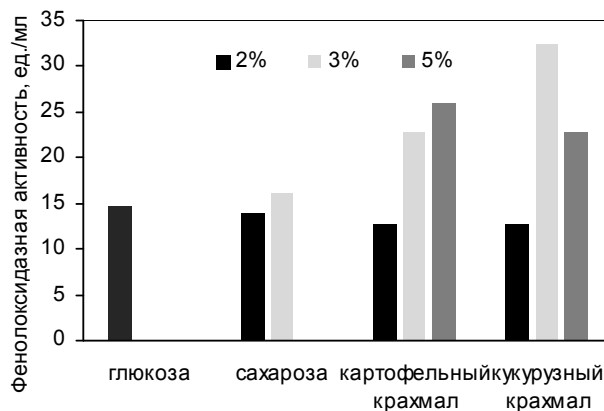


Рис. 2. Фенолоксидазная активность культуральной жидкости при поверхностном культивировании гриба *F. fomentarius* Э-14 на средах с различными углеводами в течение 11 сут

Более высокие значения фенолоксидазной активности культуральной жидкости по сравнению с контрольным вариантом были достигнуты только при концентрациях альтернативных углеводов 3–5% (рис. 2). При этом наиболее высокая окислительная активность

(32 ед./мл) была получена при использовании кукурузного крахмала в концентрации 3%. Близкое к этому значение фенолоксидазной активности (35 ед./мл, рис. 3) было достигнуто при использовании в качестве источника углерода в концентрации 3%, пшеничной муки которая, как известно, также содержит значительное количество углеводов, в том числе крахмала (64–76 %) ¹⁴.

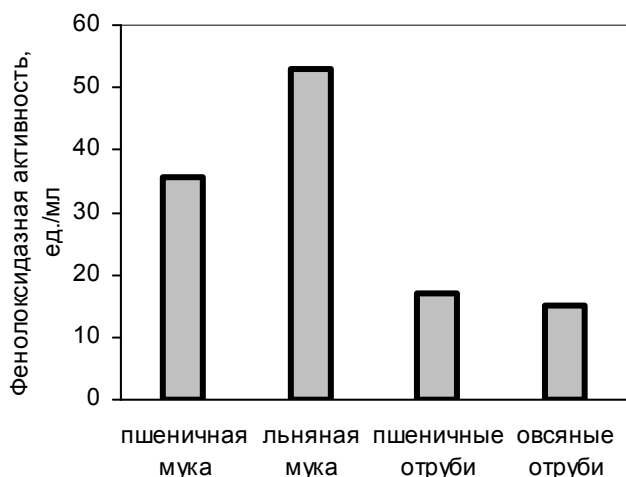


Рис. 3. Фенолоксидазная активность образцов 11-ти суточной культуральной жидкости, полученных при поверхностном культивировании гриба *F. fomentarius* Э-14 на средах с мукой и отрубями в концентрации 3%

При использовании таких лигнинсодержащих субстратов в концентрации 3%, как пшеничные и овсяные отруби (до 13% лигнина ¹⁴), в которых углеводы находятся в основном в составе клетчатки, были получены образцы культуральной жидкости с низкой окислительной активностью (15-17 ед./мл, рис. 3).

Наибольшая окислительная активность (53 ед./мл) была обнаружена в образце культуральной жидкости, полученном в присутствии 3% льняной муки (рис. 3). Это позволяет рассматривать льняную муку как перспективный источник углерода для продукции фенолоксидазных ферментов грибом *F. fomentarius* Э-14. Можно полагать, что стимулирующее действие льняной муки на синтез или активность грибных фенолоксидаз связано с наличием в ее составе не только углеводов или лигнина в оптимальном соотношении, но и с присутствием других веществ. Возможно, что полиненасыщенные жирные кислоты, имеющиеся в льняной муке ¹⁵, оказывают положительное действие на продукцию ферментов. В пользу такого предположения свидетельствует тот факт, что эфиры полиненасыщенных кислот с высоким содержанием арахидоновой кислоты

оказывают стимулирующее действие на продукцию фенолоксидаз грибом *F. fomentarius* Э-14 ¹².

С целью изучения практического потенциала фенолоксидазных ферментов гриба *F. fomentarius* Э-14 была исследована способность культуральной жидкости, полученной на среде с льняной мукой, обесцвечивать ряд синтетических красителей антрахинонового, индигоидного, трифенилметанового и азонального классов, представленных в табл. 1.

Таблица 1
Обесцвечивание красителей (100 мг/л) в присутствии культуральной жидкости гриба *F. fomentarius* Э-14 в стационарных условиях в течение 24 ч

Краситель	Структурная формула	Обесцвечивание, %
Антрахиноновый краситель		
Ремазол		89
Индигоидный краситель		
Индигокармин		79
Трифенилметановые красители		
Бромтимоловый синий		87
Ксиленовый оранжевый		46
Азокраситель		
Конго красный		14

Обесцвечивание красителей (ремазола, конго-красного, индигокармина, ксиленового оранжевого и бромтимолового синего) осуществляли в статических условиях (без перемешивания) при температуре 22 °С в течение 24 ч. Красители вносили в концентрации 100 мг/л в культуральную жидкость, разбавленную в 10 раз ацетатным буфером (рН 5.4). Фенолоксидазная активность реакционной смеси составляла 5,3 ед./мл.

В результате исследования было установлено, что азокраситель конго красный является устойчивым к ферментам гриба *F. fomentarius* Э-14 и обесцвечивается в использованных условиях не более, чем на 14% (табл. 1). Это согласуется с литературными данными о трудности разложения азокрасителей лакказами базидиомицетов ¹.

Между тем, красители антрахинонового, индигоидного и трифенилметанового классов в присутствии культуральной жидкости гриба обесцвечиваются более эффективно (табл. 1). В случае ремазола и бромтимолового синего степень обесцвечивания достигает высоких значений (87–89 %).

Для ремазола и бромтимолового синего также была изучена динамика снижения концентрации красителей в условиях дополнительной аэрации (при перемешивании реакционной смеси в колбах при 120 об./мин).

При использовании культуральной жидкости, разбавленной ацетатным буфером в 7 раз (фенолоксидазная активность реакционной смеси 7.5 ед/мл), было обнаружено, что концентрация красителей значительно снижается в течение 30 мин (рис. 4) и достигает минимального значения 7.5 мг/л в случае бромтимолового синего и 22.5 мг/л в случае ремазола.

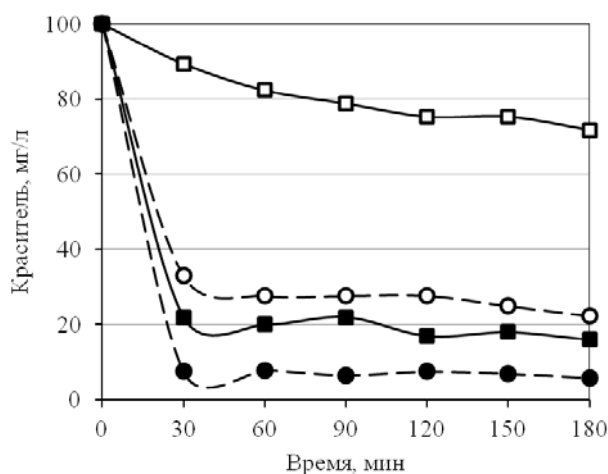


Рис. 4. Дegrаdация ремазола (сплошные линии) и бромтимолового синего (пунктирные линии) в присутствии культуральной жидкости, полученной при культивировании гриба *F. fomentarius* Э-14 на среде с льняной мукой: черные маркеры — разбавление культуральной жидкости в 7 раз; белые маркеры — разбавление культуральной жидкости в 100 раз

Дальнейшее увеличение продолжительности реакции приводит лишь к незначительному снижению концентрации красителей, вероятно,

из-за накопления в реакционной смеси продуктов деградации, ингибирующих активность фенолоксидазных ферментов ^{2, 7}.

Обнаружено, что процесс деградации красителей протекает даже в культуральной жидкости, разбавленной в 100 раз (фенолоксидазная активность реакционной смеси 0.53 ед/мл). В этих условиях концентрация ремазола снижается на 28 % в течение 3 ч (рис. 4). В случае бромтимолового синего концентрация красителя снижается на 67% уже через 30 мин, а через 3 ч — на 78%.

Таким образом, полученные результаты показывают, что внеклеточные ферменты, продуцируемые базидиомицетом *F. fomentarius* Э-14 в процессе поверхностного культивирования на жидкой среде с льняной мукой в качестве источника углерода, способны осуществлять деградацию бромтимолового синего, ремазола, индигокармина, ксиленового оранжевого, являющихся опасными загрязнителями окружающей среды. Это делает перспективным разработку эффективных методов получения препаратов фенолоксидаз гриба *F. fomentarius* Э-14 и методов их применения для очистки сточных вод от этих соединений.

Можно полагать, что фенолоксидазы гриба *F. fomentarius* Э-14 могут быть использованы также для деградации ряда других синтетических красителей антрахинонового, индигоидного и трифенилметанового классов.

Экспериментальная часть

Культивирование гриба *F. fomentarius* Э-14 при исследовании синтеза фенолоксидазных ферментов в присутствии глюкозы как источника углерода осуществляли при температуре 22 ± 1 °C на глюкозо-пептонной среде (ГПС) следующего состава, г/л: глюкоза — 20.0; пептон — 3.0; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 1.0; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.25; $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.2.

В качестве инокулята использовали 8-ми суточную культуру гриба, полученную культивированием на поверхности сусло-агара (6 °Б). Инокулят вносили в жидкую питательную среду в виде 2 агаровых блоков размером 1×1 см.

В экспериментах по поиску альтернативных источников глюкозы в составе среды ГПС заменяли крахмалом (картофельным и кукурузным), мукой (пшеничной и льняной) или отрубями (овсяными и пшеничными). Альтернативные источники углерода вносили в среду в концентрации 2, 3, или 5 %.

Фенолоксидазную активность культуральной жидкости (ед/мл) определяли спектрофотометрически по скорости окисления 10 мМ пирокатехина (ϵ 740 мМ/см⁻¹) в 0.1 М ацетатном буфере (рН 5.4) при температуре 40±1 °С. Измерение оптической плотности реакционной смеси осуществляли при длине волны 410 нм на спектрофотометре ПЭ-5400 УФ (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего окисление 1 мкмоль субстрата в течение 1 мин в оптимальных условиях ¹⁶. Концентрацию белка в культуральной жидкости определяли по методу Бредфорд ¹⁶.

Обесцвечивание красителей осуществляли в растворах культуральной жидкости, разбавленной ацетатным буфером (рН 5.4) в 7, 10 или 100 раз. Начальная концентрация красителей — 100 мг/л.

Текущий контроль концентрации красителей осуществляли спектрофотометрически на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия) при длине волны, соответствующей их максимальному поглощению: бромтимоловый синий — 490 нм, индигокармин — 630 нм, ксиленовый оранжевый — 553 нм, конго-красный — 490 нм, ремазол — 590 нм ^{1, 2}.

Степень обесцвечивания красителей (%) рассчитывали по формуле ^{2, 7}:

$$\text{Обесцвечивание}(\%) = \frac{OD_{\text{нач.}} - OD_{\text{тек.}}}{OD_{\text{нач.}}} \cdot 100\%,$$

где $OD_{\text{нач.}}$ — начальное значение оптической плотности красителя (в начальной концентрации 100 мг/л);

$OD_{\text{тек.}}$ — текущее значение оптической плотности красителя в определенный момент времени.

Литература

1. Ardila-Leal L.D., Poutou-Pinales R.A., Pedroza-Rodriguez A.M., Quevedo-Hidalgo B.E. A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes and removal by using laccases // *Molecules*.— 2021.— V.26.— Pp.3813-3852.
2. Wangpradit R., Chitprasert P. Chitosan-coated *Lentinus polychrous* Lev.: Integrated biosorption and biodegradation systems for decolorization of anionic reactive dyes // *Inter. Biodeter. Biodegrad.*— 2014.— V.93.— Pp.168-176.
3. Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties // *FEMS Microbiol. Rev.*— 2006.— V.30(2).— Pp.215-242.
4. Debnath R., Saha T. An insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.— 2020.— V.26.— Pp.1-19.
5. Arregui L., Ayala M., Gomez-Gil X. et al. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation // *Microb. Cell. Fact.*— 2019.— V.13, №4.— Pp.169-216.
6. Mikolasch A., Schauer F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*— 2009.— V.82.— Pp.605-624.
7. Neifar M., Jaouani A., Ellouze-Ghorbel R., Ellouze-Chaabouni S. Purification, characterization and decolourization ability of *Fomes fomentarius* laccase produced in solid medium // *J. Mol. Cat. B: Enzym.*— 2010.— №64(1-2).— Pp.68-74.
8. Заикина Н.А., Коваленко А.Е., Галынкин В.А., Дьяков Ю.Т., Тищенко А.Д. Основы биотехнологии высших грибов.— СПб: Проспект науки, 2007.— 336 с.
9. Проценко М.А. Получение экстрактов и характеристика биологически активных соединений из *Fomes fomentarius* // *Медицина и образование в Сибири*.— 2013.— №4.— 11 с.

References

1. Ardila-Leal L.D., Poutou-Pinales R.A., Pedroza-Rodriguez A.M., Quevedo-Hidalgo B.E. [A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes and removal by using laccases]. *Molecules*, 2021, vol.26, pp.3813-3852.
2. Wangpradit R., Chitprasert P. [Chitosan-coated *Lentinus polychrous* Lev.: Integrated biosorption and biodegradation systems for decolorization of anionic reactive dyes]. *Inter. Biodeter. Biodegrad.*, 2014, vol.93, pp.168-176.
3. Baldrian P. [Fungal laccases-occurrence and properties]. *FEMS. Microbiol. Rev.*, 2006, vol.30(2), pp.215-242.
4. Debnath R., Saha T. [An insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, vol.26, pp.1-19.
5. Arregui L., Ayala M., Gomez-Gil X. et al. [Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation]. *Microb. Cell. Fact.*, 2019, vol.13, no.4, pp.169-216.
6. Mikolasch A., Schauer F. [Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, vol.82, pp.605-624.
7. Neifar M., Jaouani A., Ellouze-Ghorbel R., Ellouze-Chaabouni S. [Purification, characterization and decolourization ability of *Fomes fomentarius* laccase produced in solid medium]. *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, 2010, no.64 (1-2), pp.68-74.
8. Zaikina N.A., Kovalenko A.E., Galynkin V.A., D'jakov Yu.T., Tishenkov A.D. *Osnovy biotekhnologii vysshikh gribov* [Fundamentals of biotechnology of higher mushrooms]. St. Petersburg, Prospekt nauki Publ., 2007, 336 p.
9. Protsenko M.A. *Polucheniye ekstraktov i kharakteristika biologicheskikh aktivnykh soyedineniy iz Fomes fomentarius* [Obtaining

10. Белова Н.В., Псурцева Н.В., Кияшко А.А. Факторы регуляции лакказной активности у базидиомитетов // Микология и фитопатология. — 2008. — Т.42, №6. — С.505-515.
11. Шараева, А. А. Халимова Л.Х., Петухова Н. И., Шакиров И. Г., Зорин В. В. Влияние глицерина на рост и окислительную активность трутового гриба — продуцента внеклеточных оксидоредуктаз // Баш. хим. ж. — 2014. — Т.21, №3. — С.17-20.
12. Шакирова А.А., Коваленко С.В., Халимова Л.Х. Исследование влияния препаратов изопропиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот на рост и фенолоксидазную активность гриба *Fomes fomentarius* Э-14 // Баш. хим. ж. — 2019. — Т.26, №1. — С.85-90.
13. Киселева С.В., Латыпова З.Ю., Аккулова З.Р., Халимова Л.Х. Исследование влияния ионов меди на рост и синтез лакказ гриба *Fomes fomentarius* Э-14 // Матер. межд. научн-техн. конф. «Актуальные проблемы науки и техники». — Уфа: Изд-во УГНТУ, 2020. Т.2. — С.215-216.
14. Электронный ресурс: <https://fitaudit.ru/food/157530>. Крахмал кукурузный — химический состав, пищевая ценность.
15. Супрунова И.А., Чижикова О.Г., Самченко-О.Н. Мука льняная — перспективный источник пищевых волокон для разработки функциональных продуктов // Техника и технология пищевых производств. — 2010. — 4 с.
16. Биссвангер Х. Практическая энзимология. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. — 328 с.
10. Belova N.V., Psurceva N.V., Kijashko A.A. *Faktery regulyatsii lakkaznoy aktivnosti u bazidiomitsetov* [Basidiomycetes laccase activity regulation factors]. *Mikologiya i fitopatologiya* [Mycology and phytopathology], 2008, vol.42, no 6, pp. 505-515.
11. Sharaeva A.A., Khalimova L.Kh., Petukhova N. I., Shakirov I.G., Zorin V.V. *Vliyanie glitserina na rost i okislitel'nyy u aktivnost' trutovogo griba — produtsenta vnekletochnykh oksidoreduktaz* [Effect of glycerol on growth and oxidative activity of polypore fungus — extracellular oxidoreductases producer]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2014, vol.21, no.3, pp.17-20.
12. Shakirova A.A., Kovalenko S.V., Khalimova L.Kh. *Issledovanie vliyaniya izopropilovykh efirov na rost i fenoloksidaznyuyu aktivnost' griba Fomes fomentarius E-14* [Research of influence of the polyunsaturated fatty acids isopropyl esters on the growth and phenoloxidase activity of fungus *Fomes fomentarius* E-14] *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2019, vol.26, no.1, pp.85-90.
13. Kiseleva S.V., Latypova G.Yu., Akkulova Z.R., Khalimova L.Kh. *Issledovanie vliyaniya ionov medi na rost i fenoloksidaznyuyu aktivnost' griba Fomes fomentarius E-14*. [Study of the effect of copper ions on the growth and synthesis of laccases of the fungus *Fomes fomentarius* E-14]. *Mater. mezhd. nauchn-tehn. konf. «Aktual'nye problemynauki i tehniki»* [Proc. of the int. sci. and tech. conf. «Actual problems of science and technology»]. Ufa, USPTU Publ., 2020, vol.2, pp.215-216.
14. *Krahmal kukuruznyi — khimicheskii sostav, pishhevaya tsennost'* [Corn starch — chemical composition, nutritional value.] Available at: <https://fitaudit.ru/food/157530>.
15. Suprunova I.A. *Muka l'nyanaya — perspektivnyi istochnik pishhevykh volokondlya razrabotki funkcional'nykh produktov* [Flaxseed flour is a promising source of dietary fiber for the development of functional products]. *Tekhnika i tehnologiya pishhevykh proizvodstv* [Technique and technology of food production], 2010, 4 p.
16. Bisswanger H. *Prakticheskaya enzimologiya* [Practical Enzymology]. Moscow, BINOM Laboratoriya znaniy Publ., 2015, 328 p.