

УДК: 528.287

ПРООКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ГРИБОВ *BJERKANDERA ADUSTA* BIMF-260 И *PLEUROTUS OSTREATUS* BIMF-247 ПРИ ТВЕРДОФАЗНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Т.В. Корнейчик, А.Н. Капич

(Международный государственный экологический университет имени А.Д. Сахарова,
г. Минск, Республика Беларусь; e-mail: kornejchik@mail.ru)

Установлено, что культуральные фильтраты дереворазрушающих базидиомицетов белой гнили *Bjerkandera adusta* BIMF-260 и *Pleurotus ostreatus* BIMF-247, полученные при твердофазном культивировании, обладают прооксидантной активностью, которая выражается в их способности инициировать реакции перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот, в частности линолевой кислоты. Прооксидантная активность, обнаруженная в культуральных фильтратах грибов, зависит от наличия лигнинолитических ферментов, в первую очередь лигнинолитических пероксидаз.

Ключевые слова: дереворазрушающие базидиомицеты, прооксидантная активность, лигнинолитические ферменты.

Дереворазрушающие базидиальные грибы, вызывающие белую гниль древесины, обладают уникальной способностью к разрушению одного из наиболее устойчивых природных биополимеров — лигнина [1]. Разрушение лигнина происходит под воздействием лигнинолитических ферментов этих грибов, к которым относятся пероксидазы, лакказы, а также некоторые другие оксидоредуктазы [2, 3]. Данные ферменты характеризуются широкой субстратной специфичностью и способны катализировать не только разрушение лигнина, но и разложение широкого круга органических соединений, загрязняющих окружающую среду и обладающих токсическим действием. Это открывает возможность для использования дереворазрушающих базидиомицетов при биоремедиации [4]. Неспецифический характер действия энзиматических систем дереворазрушающих базидиомицетов связывают с тем, что лигнинолитические ферменты этих грибов катализируют образование низкомолекулярных свободных радикалов, в том числе перекисных радикалов липидов, которые обладают высокой реакционной способностью [5]. Ранее было показано, что культуральные жидкости некоторых базидиомицетов, полученные при глубинном и поверхностном культивировании, проявляют выраженные прооксидантные свойства, которые заключаются в их способности инициировать перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот, в частности линолевой кислоты [6, 7]. Целью данной работы было изучение прооксидантных свойств дереворазрушающих базидиомицетов белой гнили *Bjerkandera adusta* BIMF-260 и *Pleurotus ostreatus* BIMF-247 в условиях твердофазного культивирования на лигноцеллюлозном субстрате — льняной костре.

Материалы и методы исследования

Штаммы грибов *B. adusta* BIMF-260 и *P. ostreatus* BIMF-247 хранятся в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов (научная коллекция типовых и промышленно ценных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси). Штамм *Gloeophyllum sepiarium* 0155 был получен из коллекции культур базидиомицетов Ботанического института имени В.Л. Комарова (г. Санкт-Петербург, Россия). Твердофазное культивирование грибов проводили в стационарных условиях при 26° в колбах на лигноцеллюлозном субстрате (льняной костре), увлажненном глюкозопептонной средой (конечная влажность субстрата 80%) [8]. Инокуляцию субстрата осуществляли агаровыми дисками соответствующих культур грибов. Для получения культуральных фильтратов (КФ) субстрат, покрытый мицелием, отжимали в шприце, а собранные фильтраты центрифугировали при 3000 об/мин в течение 6 мин.

Прооксидантную активность КФ дереворазрушающих базидиомицетов определяли по скорости поглощения кислорода в реакции перекисного окисления линолевой кислоты с помощью оксиграфа (Hansatech, England) [6]. Активность марганец пероксидазы (МнП) измеряли спектрофотометрически по скорости окисления Mn^{2+} , а также по скорости окисления модельного фенольного соединения 2,6-диметоксифенола (ДМФ) [9]. Параллельно измеряли активность лакказы с ДМФ аналогичным способом, однако в этом случае в реакционную смесь не добавляли растворы $MnSO_4$ и H_2O_2 . Активность широкоспецифичной пероксидазы (ШСП) также измеряли в реакции с ДМФ, однако в этом случае в реакционную смесь не вносили $MnSO_4$. За единицу активности ферментов принимали количество фер-

мента, которое катализирует образование 1 мкмоль димера ДМФ в течение 1 мин.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 показаны кривые поглощения кислорода в реакциях перекисного окисления линолевой кислоты, инициированных КФ грибов, которые были получены после 28 дней твердофазного культивирования. Как видно, КФ *B. adusta* BIMF-260 и *P. ostreatus* BIMF-247 обладали прооксидантной активностью. Данная активность проявляется в том, что КФ инициируют реакции перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот, в частности линолевой кислоты, идущие с поглощением O_2 . Эти грибы являются типичными возбудителями белой гнили древесины и способны активно разрушать лигнин. КФ гриба *Gloeophyllum sepiarium* 0155, который является типичным грибом бурой гнили древесины и не способен разрушать лигнин, не проявлял прооксидантную активность в условиях твердофазного культивирования на льняной костре.

Прооксидантная активность культур дереворазрушающих базидиомицетов может быть обусловлена лигнинолитическими ферментами, которые продуцируют грибы белой гнили, в частности МнП. Вывод о важности лигнинолитических пероксидаз для проявления прооксидантных свойств КФ грибов подтверждается результатами сопоставления прооксидантной активности и активности лигнинолитических пероксидаз в динамике роста *B. adusta* BIMF-260 и *P. ostreatus* BIMF-247. Как видно из данных, представленных на рис. 2, изменения значений прооксидантной активности и активности лигнинолитических пероксидаз при твердофазном культивировании *P. ostreatus* BIMF-247 имели согласованный характер. Данные активности появлялись в КФ после 7 сут роста, достигали максимума на 21-е сут, после чего отмечалось их одновременное снижение. Изменения значений прооксидантной активности

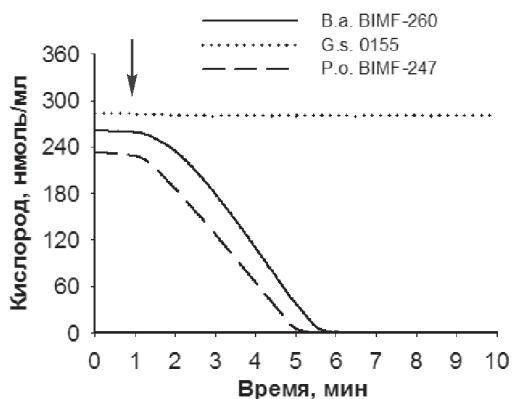


Рис. 1. Поглощение кислорода в реакциях перекисного окисления линолевой кислоты, инициированного КФ дереворазрушающих базидиомицетов (*Bjerkadere adusta* BIMF-260 — B.a. BIMF-260, *Gloeophyllum sepiarium* 0155 — G.s. 0155, *Pleurotus ostreatus* BIMF-247 — P.o. BIMF-247). Стрелка указывает время добавления КФ

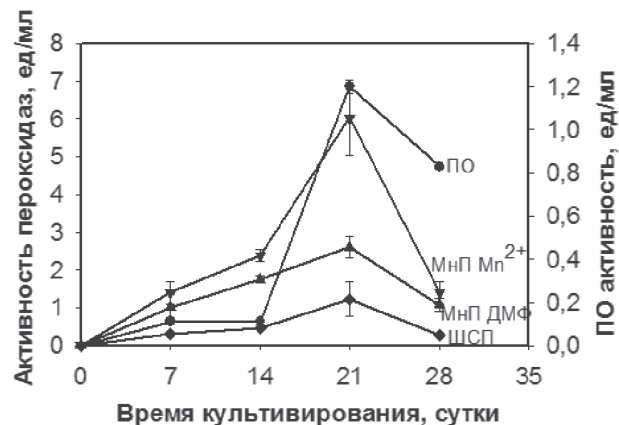


Рис. 2. Динамика прооксидантной активности (ПО) и активности лигнинолитических пероксидаз: марганец пероксидазы по скорости окисления Mn^{2+} (МнП Mn^{2+}), марганец пероксидазы по скорости окисления ДМФ (МнП ДМФ) и широкоспецифичной пероксидазы (ШСП) при твердофазном культивировании *P. ostreatus* BIMF-247

и активности лигнинолитических пероксидаз в КФ *B. adusta* BIMF-260 были менее согласованы и носили более сложный характер (рис. 3). В первые 14 сут культивирования наблюдалось параллельное увеличение прооксидантной активности и активности лигнинолитических пероксидаз. Однако на 21-е сут культивирования отмечалась максимальная активность пероксидаз, в то время как прооксидантная активность начала снижаться. По-видимому, это связано с тем, что в КФ данного гриба появлялись антиоксидантные соединения, ингибирующие инициацию перекисного окисления линолевой кислоты в тесте на прооксидантную активность.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что дереворазрушающие базидиомицеты белой гнили *B. adusta* BIMF-260 и *P. ostreatus* BIMF-247 способны проявлять в условиях твердофазного культивирования на лигноцел-



Рис. 3. Динамика прооксидантной активности (ПО) и активности лигнинолитических пероксидаз: марганец пероксидазы по скорости окисления Mn^{2+} (МнП Mn^{2+}), марганец пероксидазы по скорости окисления ДМФ (МнП ДМФ) и широкоспецифичной пероксидазы (ШСП) при твердофазном культивировании *B. adusta* BIMF-260

люлозных субстратах прооксидантную активность. Данная активность зависит от наличия в КФ этих грибов лигнинолитических ферментов, в первую очередь лигнинолитических пероксидаз. Обнаружение прооксидантной активности в КФ дереворазруша-

ющих базидиомицетов при твердофазном культивировании позволяет рекомендовать их для дальнейших исследований в качестве потенциальных биоремедиационных агентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hatakka A. Biodegradation of lignin // Biopolymers. Vol. 1. Lignin, Humic substances and coal / Eds. M. Hofrichter, A. Steinbüchel. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. P. 129—180.
2. Martinez A.T., Speranza M., Ruiz-Dueñas F.J. et al. Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin // Intern. Microbiol. 2005. Vol. 8. N 1. P. 195—204.
3. Hammel K. E., Cullen D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis // Current opinion in plant biology. 2008. Vol. 11. N 3. P. 349—355.
4. Рабинович М.Л., Болобова А.В., Васильченко Л.Г. Разложение природных ароматических структур и ксенобиотиков грибами // Прикл. биохим. микробиол. 2004. Т. 40. № 1. С. 5—23.
5. Kapich A.N., Jensen K.A., Ham K.E. Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation // FEBS Letters. 1999. Vol. 461. P. 115—119.
6. Kapich A.N., Prior B.A., Lundell T., Hatakka A. A rapid method to quantify pro-oxidant activity in cultures of wood-decaying white-rot fungi // J. of Microbiol. Met. 2005. N 61. P. 261—271.
7. Kapich A.N., Steffen K.T., Hofrichter M., Hatakka A. Involvement of lipid peroxidation in the degradation of a non-phenolic lignin compound by manganese peroxidase of the litter-decomposing fungus *Stropharia coronilla* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. Vol. 330. N 2. P. 371—377.
8. Кануч А.Н. Биосинтетическая активность дереворазрушающих базидиомицетов при глубинном культивировании // Микол. и фитопатол. 1990. Т. 24. № 5. С. 377—384.
9. Wariishi H., Valli K., Gold M.H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. P. 23688—23695.

Поступила в редакцию
02.06.10

PROOXIDANT ACTIVITY OF FUNGI *BJERKANDERA ADUSTA* BIMF-260 AND *PLEUROTUS OSTREATUS* BIMF-247 IN SOLID-STATE CULTURE

T.V. Korneichik, A.N. Kapich

Wood-decaying white rot basidiomycetes *Bjerkandera adusta* BIMF-260 and *Pleurotus ostreatus* BIMF-247 were found to show prooxidant activity in solid-state culture on lignocellulose substrate — flax straw. The prooxidant activity in the culture filtrates of the wood-decaying fungi depends on the presence of ligninolytic enzymes and first of all peroxidases.

Key words: wood-decaying basidiomycetes, prooxidant activity, ligninolytic enzymes.

Сведения об авторах

Корнейчик Татьяна Валерьевна — аспирантка, кафедра иммунологии факультета экологической медицины Международного государственного экологического университета имени А.Д. Сахарова, г. Минск, Республика Беларусь. E-mail: korneichik@mail.ru

Капич Александр Николаевич — проф. кафедры иммунологии факультета экологической медицины Международного государственного экологического университета имени А.Д. Сахарова, г. Минск, Республика Беларусь. E-mail: kapich@wisc.edu