# Изучение продукции лакказы штаммом Funalia trogii ТИ 035

Ольга Стерляжникова, Антон Клепиков, Марк Шамцян

***The study of laccase production strain Funalia trogii TI 035:*** *Laccases are a major ligninolytic enzymes. Laccases from basidiomycetes have a high redox potential and broad substrate specificity, enabling their widespread use in the industry, such as pulp and paper, food processing, with the synthesis of pharmaceuticals and other areas.*

***Key words***: *laccase, lignin, submerged cultivation.*

## ВЪВЕДЕНИЕ

Лакказа является одним из немногих ферментов, которые изучались с конца 19-го века. Известные в течение длительного времени лакказы привлекли большое внимание только после начала исследования их роли в деградации древесины дереворазрушающими грибами белой гнили [1]. На сегодняшний день выделено и описано более 100 лакказ [2].

Способность базидиальных грибов синтезировать внеклеточные ферменты, характеризизующиеся высокой активностью и стабильностью, даёт возможность использовать их ферментные комплексы для практических целей [3]. Высшие базидиальные грибы осуществляют в природе деструкцию таких сложных биополимеров, как целлюлоза, гемицеллюлозы, лигнин, пектиновые вещества [4].

Лакказа (*п*-дифенол: кислород оксидоредуктаза, КФ 1. 10.3.2) является одним из основных лигнинолитических ферментов. Голубые лакказы (медьсодержащие белки) из базидиальных грибов способны катализировать процесс четырёх электронного восстановления молекулы кислорода до двух молекул воды, при этом в качестве промежуточного продукта не образуется ни перекиси водорода, ни каких либо других кислородных интермедиаторов [5].

Фермент обладает высоким окислительно-восстановительным потенциалом и широкой субстратной специфичностью. Благодаря этому ферментный препарат может применяться в самых разных областях промышленности: целлюлозно-бумажной, текстильной, тонком органическом синтезе, пищевой, косметической, производстве современных экологически чистых древесно-волокнистых плит, производстве моющих средств, отбеливающей зубной пасты, для биодеградации ксенобиотиков, энергетике, синтезе лекарственных препаратов, в биосенсорах, иммуноферментном анализе, для очистки сточных вод [6].

Однако широкое применение ограничивается высокой стоимостью фермента [7], поэтому в настоящее время ведётся поиск новых эффективных продуцентов высокоактивных и стабильных лакказ для снижения стоимости получаемых ферментов.

## ИЗЛОЖЕНИЕ

В данной работе изучалась продукция лакказы штаммом Funalia trogii ТИ 035, выбранной в качестве активного продуцента лакказ в результате скрининга культур базидиальных грибов из коллекции кафедры технологии микробиологического синтеза СПбГТИ(ТУ). Культура выращивалась в глубинных условиях на глюкозо-пептонных средах с различными соотношениями источника C:N. В качестве индуктора вносились катионы $Cu^{2+}$. Экстрацеллюлярную оксидазную активность определяли в нативном растворе культуральной жидкости спектрофотометрически при 410 нм. В качестве хромогенного субстрата использовали 0,01 М раствор пирокатехина в 0,1 М цитратном буфере, pH 4,96. Выделение фермента проводили методом высаливания, а очистку методом гель-фильтрации.

Определение pH оптимумов окисления 0,01 М раствора пирокатехина проводили в цитратно-фосфатной буферной системе в диапазоне pH 2,2-8,0.

Температурный оптимум определяли в диапазоне температур 25 °С – 85 °С по скорости окисления 0,01 М раствора пирокатехина в 0,1 М цитратном буфере, pH 4,96. Для оценки термостабильности лакказы фермент инкубировали при температурах от 50 до 90 °С в течение часа, измеряя остаточную активность через каждые 5 мин.

Определяли потребность культуры в кислороде. Для создания различных уровней аэрации варьировали объём питательной среды в колбах. Интенсивность аэрации определяли сульфитным методом.

Определяли константы Михаэлиса и максимальной скорости ферментативной реакции для трёх субстратов: пирокатехина, галловой кислоты, жёлтой кровяной соли. Кинетические параметры находили в координатах Лайнуивера-Берка или двойных обратных координатах.

Результаты опыта, представленные на рис. 1, показали значительное увеличение оксидазной активности в культуральной среде штамма Funalia trogii ТИ 035 при культивировании его на средах с высоким содержанием азота. Максимальная оксидазная активность 51,34 Ед/мл была достигнута на питательной среде с соотношением углерода к азоту равным 2:1 на 14 сутки культивирования.

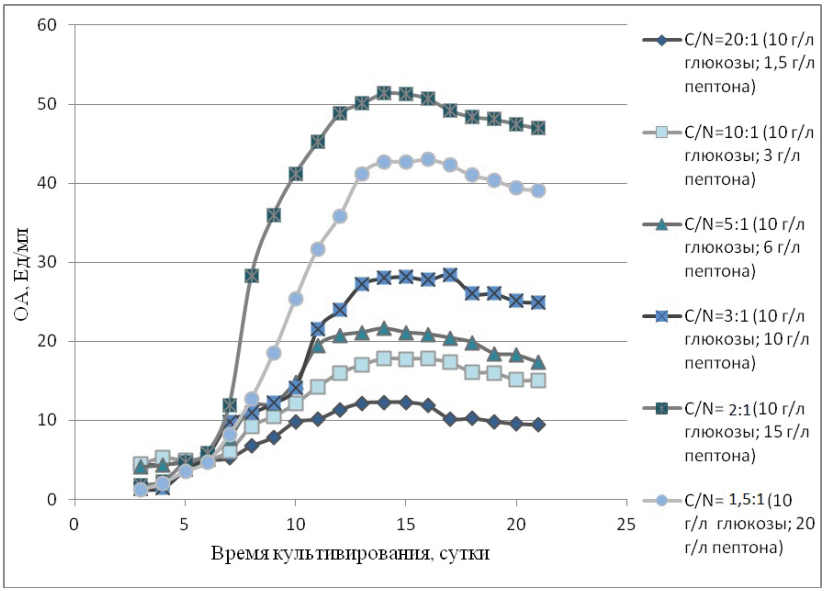



Рисунок 1 Динамика оксидазной активности в культуральной среде штамма Funalia trogii ТИ 035 в зависимости от соотношения в питательной среде углерода и азота

Зависимость активности лакказы чистого фермента (максимально очищенного) от pH буферного раствора содержащего пирокатехин (субстрат) представлена на рисунке 2. Каталитическая активность фермента наивысшая в диапазоне pH 4,6-5,6.

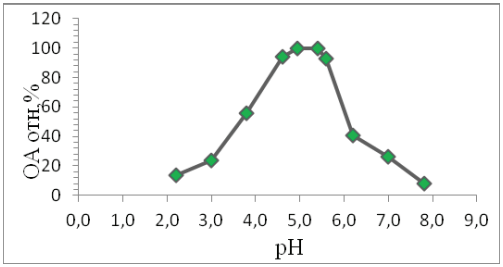



Рисунок 2 pH-зависимость активности лакказы в универсальном буфере (субстрат пирокатехин). За 100% принималась максимальная активность фермента

Влияние температуры на активность лакказы чистого фермента (максимально очищенного) показано на рисунке 3. Максимальная активность фермента наблюдается при температуре 52 ºС и остаётся близкой к максимальной в диапазоне температур 49-59 ºС.

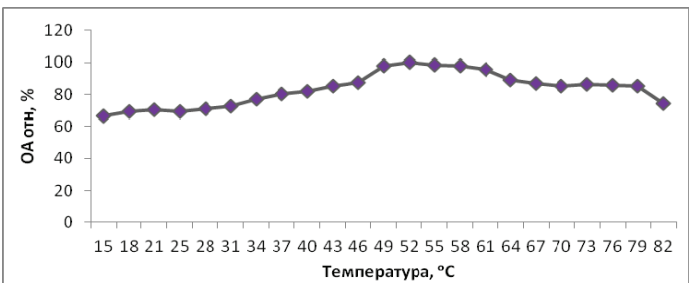



Рисунок 3 Зависимость активности лакказы от температуры

Термическая стабильность лакказы чистого фермента (максимально очищенного) показана на рисунке 4. Полученные данные показали, что изучаемая лакказа обладает высокой для грибной лакказы термостабильностью [1] - теряет меньше 10% активности в течении часа при 70 ºС и меньше 40% активности в течении часа при 80 ºС. Высокая термостабильность фермента, особенно в зоне его температурного оптимума значительно расширяют возможности его применения.

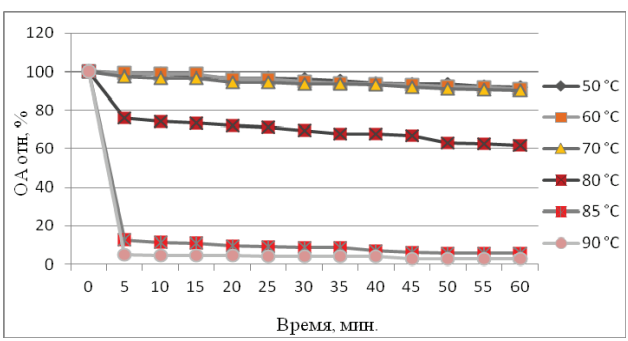



Рисунок 4 Термостабильность лакказы

Из рисунка 5 следует, что аэрация существенно не влияет как на оксидазную активность фермента. Таким образом, повышенной потребности культуры в кислороде в изучаемом диапазоне не выявлено.

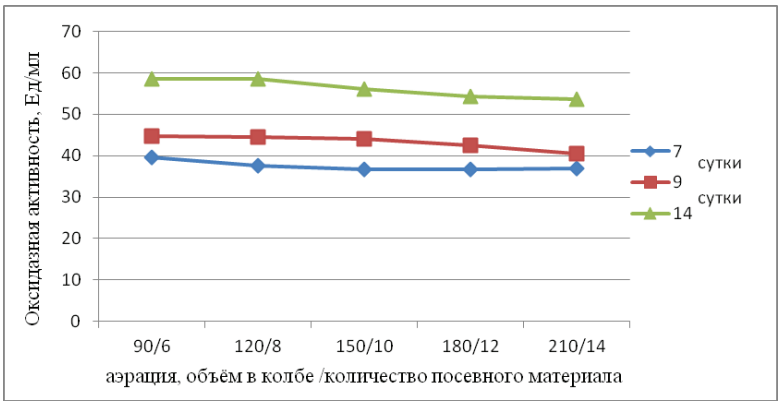
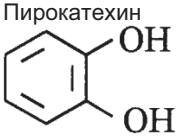
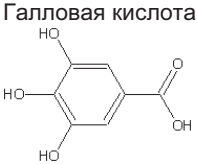



Рисунок 5 Зависимость аэрации от оксидазной активности в различные сутки культивирования

На основе зависимостей, определённых графически, были определены кинетические характеристики - константа Михаэлиса и максимальня скорость ферментативной реакции, которые представлены в таблице 1. Сравнение каталитических параметров показало, что константы Михаэлиса для пирокатехина выше, чем для жёлтой кровяной соли и галловой кислоты, что свидетельствует о более низком сродстве пирокатехина к ферменту лакказы. Для жёлтой кровяной соли величина $V_{max}/K_m$ выше, по сравнению с пирокатехином и галловой кислотой, что говорит об эффективности катализа окисления субстрата типичного гексацианоферрату (II) калия.

Таблица 1 – Значения константы Михаэлиса и максимальной скорости ферментативной реакции

| Субстрат | $K_m$, моль/л | $V_{max}$, моль·л$^{-1}$·мин$^{-1}$ | $V_{max}$ / $K_m$, мин |
|---|---|---|---|
| Пирокатехин   | 0,00328 | 0,0000200 | 0,00610 |
| Галловая кислота   | 0,000165 | 0,00000261 | 0,0158 |
| Жёлтая кровяная соль $K_4[Fe(CN)_6]$ | 0,000326 | 0,0000725 | 0,222 |

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проанализировав полученные данные, можно сделать вывод, что данный штамм Funalia trogii ТИ 035 является перспективным продуцентом для промышленного получения термостабильной лакказы.

## ЛИТЕРАТУРА

[1] Baldrian P. Fungal laccase – occurrents and properties // FEMS Microbiol Rev 30 – 2006. – p.215-242.

[2] Черкашин Е. А. Структурно-генетическая организация лакказ базидиальных грибов : автореф. дис. … к-та хим. наук / Е. А. Черкашин ; МГУ, – М. : Изд. Унив., 2009. – 23 с.

[3] Королёва О. В., Степанов Е. В., Линдесман Е. О., Васильченко Л. Г., Хромоныгина В. В., Жердев А. В., Рябинович М. Л. Иммуноферментный анализ разложения гербецида почвенными и дереворазрушаемыми грибами // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38. - №4. – С. 413-418.

[4] Королева О. В. Лакказы базидиомицетов: свойства, структура, механизм действия и практическое применение: Автореф. дис. … д-ра биол. наук. М., 2006. 50 с.

[5] Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G . Laccases: a never-ending story // Cell Mol Life Sci. 2009. Vol. 67. P. 369–385.

[6] Русинова, Т. В. Разработка технологии биосинтеза фермента лакказы базидиальными грибами рода Trametes: автореф. дис. канд. хим. наук: М. , Изд. Унив., 2007. С. 20.

[7] Абянова А. Р., Чулкин А. М., Вавилова Е. А., Фёдорова Т. В., Логинов Д. С., Королёва О. В., Беневоленский С. В. Гетерологичная продукция лакказы Trametes hirsute в грибах Penicillium canescens // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. №3. С. 342-347.

**Для контактов:**

Стерляжникова Ольга Васильевна, кафедра технологии микробиологического синтеза СПбГТИ(ТУ), первый курс магистратуры, email: olya.sterlyazhnikova@gmail.ru

Клепиков Антон Александрович, аспирант кафедры технологии микробиологического синтеза СПбГТИ(ТУ)

Шамцян Марк Маркович, кандидат технических наук, доцент кафедры технологии микробиологического синтеза СПбГТИ(ТУ), email: mark.shamtsyan@yandex.ru

**Доклад рецензирован**