

УДК 577.152.192.3

РОЛЬ ИОНОВ ДВУХВАЛЕНТНОГО МАРГАНЦА В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ЛИГНИНОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *TRAMETES PUBESCENS*

О.В. Никитина¹, С.В. Шлеев¹, Е.С. Горшина², Т.В. Русинова², А.И. Ярополов¹

(Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН¹; e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru; Московский государственный университет инженерной экологии²; e-mail: gorshina@msuie.ru)

В работе предложена схема взаимодействия лигнинолитических ферментов базидиального гриба *Trametes pubescens* - лакказы, лигнинпероксидазы и марганецпероксидазы. Показана роль ферментативного окисления ионов двухвалентного марганца, катализируемого лакказой базидиомицета *T. pubescens* в присутствии хелатирующих агентов (ионов тартрата и оксалата) в функционировании ферментов лигнинолитического комплекса.

Способность к глубокому разложению и усвоению лигнина описана для грибов различных таксономических групп, в частности аскомицетов и базидиомицетов. Внеклеточные ферментные системы этих грибов построены наиболее сложно и включают спектр множественных форм оксидоредуктаз (гем-содержащих, флавиносодержащих и медьсодержащих ферментов).

Лигнинолитический комплекс базидиального гриба *Trametes (Coriolus) pubescens* представлен следующими ферментами: лакказа (Lc) [1, 2], лигнинпероксидаза (LiP) и марганецпероксидаза (MnP) [2], а также целлобиозодегидрогеназа (CDH) [3].

Лакказа (*n*-дифенол:кислород оксидоредуктаза, КФ 1.10.3.2), многоядерная медьсодержащая оксидаза, является одним из самых распространенных представителей ферментов, способных трансформировать ароматические субстраты. Основная каталитическая функция Lc – окисление широкого круга органических и неорганических субстратов молекулярным кислородом. При каталитическом процессе происходит координированное взаимодействие четырех ионов меди трех различных типов, входящих в активный центр фермента. В результате осуществляется внутримолекулярный перенос четырех электронов от субстрата-донора на диоксигород, восстанавливающийся до воды.

Физиологическая роль и механизм действия Lcs окончательно не выяснены. Известно, что этот фермент играет важную роль в процессах развития и морфогенеза грибов и растений, детоксификации, образовании и деградации лигнина, гумификации

органических остатков [4–6]. Lc является одним из важнейших компонентов лигнинолитического ферментного комплекса дереворазрушающих грибов, однако до последнего времени считалось, что ее роль сводится лишь к окислению фенольных подструктур лигнина. Современные исследования базидиальных грибов в этой области показали, что Lc в сочетании с MnP и (или) LiP при деградации лигнина может выполнять существенно более значимые функции, чем окисление его фенольных подструктур [7, 8]. Для ряда лигнинразрушающих грибов характерно образование алифатических дикарбоновых кислот, таких как щавелевая [9], малоновая и фумаровая [10].

Марганец в микроколичествах присутствует в различных лигноцеллюлозных материалах. Ионы трехвалентного марганца (Mn³⁺) являются сильным окислителем и способны непосредственно окислять нефенольные подструктуры лигнина. Они образуются при ферментативном окислении из ионов двухвалентного марганца (Mn²⁺), являющегося основным субстратом MnP, и играют значительную роль в катализе LiP [11]. Дикарбоновые или α-оксикарбоновые кислоты являются оптимальными комплексонами Mn²⁺ и Mn³⁺ и одновременно обеспечивают необходимый pH среды благодаря своим буферным свойствам [12].

Ранее было показано, что лакказа из базидиомицета *Trametes versicolor* катализирует окисление Mn²⁺ до Mn³⁺ в присутствии хелатирующего агента – Напирофосфата [7]. Использование оксалата и малоната в качестве комплексообразующих агентов ионов Mn³⁺ ведет к образованию супероксиданион радикала с последу-

ющим его превращением в пероксид водорода [8]. В этой связи важным представляется выявление возможности протекания этих реакций с Lcs из других источников для установления роли этого фермента при функционировании лигнинолитического комплекса дереворазрушающих грибов.

Цель настоящей работы – изучение процесса каталитического окисления Mn^{2+} до Mn^{3+} в присутствии хелатирующих агентов, катализируемого Lc базидиального гриба *Trametes pubescens*, а также выяснение физиологической роли данной реакции в функционировании основных ферментов лигнинолитического комплекса – Lc, LiP и MnP.

Методы исследования

Организм и условия культивирования. Культуральную жидкость с высоким содержанием Lc получали путем глубинного культивирования штамма продуцента внеклеточной Lc гриба *Trametes pubescens* (*Schumacheri*) *Pilát* (Syn.: *Coriolus pubescens* (*Schum. ex Fr.*) *Quél.*) ВСБ 923-2, которое проводили в тридцатилитровом ферментационном аппарате (“*Marubishi*”, Япония) с рабочим объемом 20 л, при избыточном давлении 0,4 атм. Аэрация воздухом в стерильных условиях составляла 1л/1л в мин при механическом перемешивании (250 об/мин) мешалкой турбинного типа на среде следующего состава (г/л): глюкоза – 20,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 2,5; KH_2PO_4 – 1,2; мочевины – 0,7; кукурузный экстракт сгущенный – 10; вода водопроводная. Процесс культивирования проводили в условиях рН-статирования при рН 3,5 и температуре 26°C. Посевной материал в количестве 10% от объема среды в ферментере выращивали в колбах объемом 750 мл с заполнением средой до 150 мл на круговой качалке (180 об/мин) при температуре 26°C. Продолжительность культивирования составила 114 ч, что соответствовало стационарной фазе, начавшейся на шестидесятом часу роста через 12 ч после максимума оксидазной активности. Биомассу отделяли путем фильтрования через полиамидный материал.

Культуральную жидкость с высоким содержанием MnP и LiP получали путем глубинного культивирования того же штамма гриба *T. pubescens* в колбах на круговой качалке (200 об/мин, 28°C) без рН-статирования. Процесс культивирования проводили на среде того же состава. Продолжительность культивирования составляла 86 ч.

Выделение и очистка ферментов. Выделение и очистку препарата Lc проводили в соответствии со

следующей схемой: осаждение белков из культуральной жидкости сульфатом аммония в диапазоне насыщения 0-90%; ионообменная хроматография низкого давления на носителях Сервацел DEAE 52 и Toyopearl DEAE 650M; ВЖХ (гель-фильтрация) с использованием колонки Bio Sep-SEC-S 2000 (“*Phenomenex*”, США); ионообменная хроматография с использованием колонки TSK DEAE-2SW (“*Pharmacia LKB Biotechnology*”, Швеция).

Выделение и очистку MnP и LiP проводили по следующей схеме: осаждение белков из культуральной жидкости сульфатом аммония в диапазоне насыщения 0–90%; ионообменная хроматография низкого давления на носителе Сервацел DEAE 52; гидрофобная хроматография среднего давления на колонке Phenyl-Superose FPLC (“*Pharmacia LKB Biotechnology*”, Швеция).

Определение молекулярной массы и изоэлектрофокусирование. Молекулярную массу определяли методом градиентного Ds-Na-ПААГ-электрофореза с использованием метода, описанного в работе [13]. Изоэлектрофокусирование проводили по методу [14] с использованием амфолинов широкого диапазона рН (3,8–9,3) (“*Pharmacia LKB Biotechnology*”, Швеция”) и ячейки для ИЭФ Model 111 Mini IEF Cell (“*BIO-RAD*”, США).

Спектральные исследования. Для спектрофотометрических исследований использовали спектрофотометр “*Hitachi-557*” (Япония).

Контроль активности ферментов в процессе выделения и очистки осуществляли спектрофотометрическими методами: Lc [15, 16], используя в качестве хромогенного субстрата 10 мМ раствор пирокатехина ($\lambda = 410$ нм; $\epsilon = 740$ М⁻¹ см⁻¹) в 0,1 М Na-цитрат-фосфатном буфере рН 4,5; LiP [17] в присутствии 8 мМ раствора 2,2'-азинобис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоната) (АБТС) ($\lambda = 436$ нм; $\epsilon = 36000$ М⁻¹ см⁻¹) и 1 мМ раствора H₂O₂ в 0,1 М Na-ацетатном буфере рН 4,5; MnP [18], используя в качестве субстрата Mn^{2+} при 238 нм ($\epsilon = 6500$ М⁻¹ см⁻¹) в 0,1 М Na-тарtratном буфере рН 5,0 в присутствии 0,1 мМ раствора H₂O₂; CDH [19] в присутствии целлобиозы по восстановлению дихлорфенолиндофенола ($\lambda = 520$ нм; $\epsilon = 6300$ М⁻¹ см⁻¹). Регистрацию окисления Mn^{2+} до Mn^{3+} , катализируемого Lc, проводили в 0,1 М Na-тарtratном буфере (рН 5,0) с использованием метода, описанного в работе [18], и в 0,1 М Na-оксалатном буфере (рН 5,0) по методу [8] в присутствии 0,1 мМ MnSO₄. Продукт реакции (Mn^{3+}) образует малостабильные комплексы с анионами тартрата и оксалата,

имеющие характерные пики поглощения при 238 нм и 270 нм соответственно.

Образование пероксида водорода в системе, содержащей Lc, Mn^{2+} и хелатор, регистрировали с помощью LiP по окислению АБТС. Для этого реакционную смесь, содержащую $2 \cdot 10^{-7}$ М Lc и 0,1 мМ $MnSO_4$ в 0,1 М Na-тарtratном или Na-оксалатном буферном растворе (рН 5,0), инкубировали в течение 120 мин при комнатной температуре, а затем подвергали ультрафильтрации через мембранные фильтры с диаметром пор 12 кД путем центрифугирования в течение 30 мин при 10000 об/мин для удаления Lc. Концентрацию H_2O_2 определяли по увеличению оптической плотности в реакции окисления АБТС, катализируемой LiP. Образование супероксиданион-радикала регистрировали по восстановлению нитросинего тетразолия (концентрация 0,2 мМ) при 560 нм [20].

Измерение рН-зависимости реакции окисления гваякола, катализируемое Lc, проводили в 0,1 М цитрат-фосфатном буфере (рН 4,5; $\lambda = 436$ нм), используя молярный коэффициент поглощения продукта окисления, равный $25500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Белок определяли спектрофотометрическим методом, описанным в работе [21].

Электрохимические эксперименты проводили на вольтамперометрическом анализаторе "CV-50W" ("BAS", США), используя трехэлектродную электрохимическую ячейку. В качестве рабочего электрода использовали стеклоглеродный электрод ("BAS", США), электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод той же фирмы (+210 мВ относительно нормального водородного электрода), а вспомогательным – платиновая проволока диаметром 1 мм. Все потенциалы в данной работе приведены относительно нормального водородного электрода. Перед проведением экспериментов поверхность рабочего электрода полировали алюминиевой пастой (Al_2O_3), а затем многократно промывали деионизированной водой.

Циклические вольтамперограммы записывали в 0,1 М Na-тарtratном буферном растворе (рН 5,0) на обновленной поверхности электрода в интервале потенциалов 0–1200 мВ при варьировании скорости сканирования потенциалов от 10 до 100 мВ.

Реактивы, использованные в работе: Toyopearl DEAE 650M ("Tosoh", Япония); 2-меркаптоэтанол ("Ferak", Германия); кумасси голубой R-250, наборы белков-метчиков для электрофореза ("Serva", Германия); трис, глицин, акриламид, N,N-метиленбисакри-

ламид, аммоний надсерноокислый ("ICN", США); сервацел ДЕАЕ 52 ("Reanal", Венгрия); пирокатехин ("Sigma", США); Na_2HPO_4 ("Merck", Германия); глицерин, метанол, HCl, H_3PO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, NaOH, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $C_2Na_2O_4$, нитросиний тетразолий, винная кислота, лимонная кислота, глюкоза, мочевины – отечественные препараты ("ос.ч." и "х.ч."). Все растворы, за исключением растворов для ферментации, готовили с использованием деионизированной воды, полученной на установке "Milli Q" ("Millipore", США).

Результаты и обсуждение

Для выполнения поставленных задач из культуральной жидкости базидиального гриба *T. pubescens* выделены гомогенные по данным градиентного SDS-электрофореза препараты Lc, LiP и MnP. Основные биохимические характеристики ферментов представлены в таблице. Показано, что в описанных условиях культивирования в культуральной жидкости базидиомицета *T. pubescens* преобладала либо оксидазная, либо пероксидазная активности, в то время как целлюлозодегидрогеназная активность была незначительна или вовсе отсутствовала.

Из литературных данных известно, что двухвалентный марганец, являясь основным субстратом MnP, играет значительную роль в каталитическом цикле LiP [11]. Нас интересовала возможность окисления ионов Mn^{2+} дикислородом в присутствии Lc. Одним из основных параметров, от которого зависит скорость окисления субстратов лакказы, является различие в потенциалах донора и первичного акцептора электронов фермента (Г1-центр). Известно, что ре-

Основные биохимические характеристики ферментов лигнинолитического комплекса базидиомицета *T. pubescens*

Фермент	Удельная активность (мкмоль/мин на мг белка)	MW (кД)	pI
Lc	66,7	67	5,3
LiP	15,5	45	4,2
MnP	40,0	54	–

Примечание. Результаты рассчитаны как среднее значение по трем измерениям.

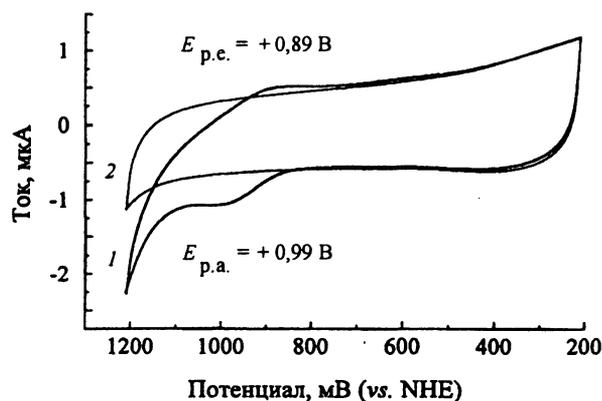


Рис. 1. Циклические вольтамперограммы, записанные с помощью стеклоуглеродного электрода в 0,1 М Na-тарtratном буфере, pH 5,0, в присутствии (1) и в отсутствие (2) 0,2 мМ MnSO_4 (скорость развертки потенциала 50 мВ/с; начальный потенциал 0,0 мВ)

докс-потенциалы Т1-центров высокопотенциальных Lcs базидиальных грибов (например, *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea*, *Corioloropsis fulvocinerea* и *Cerrena maxima*) находятся в области 750-800 мВ [22], в то время как редокс-потенциал пары $\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{3+}$ (аквакомплекс) составляет 1510 мВ [23], что существенно превышает потенциал первичного акцептора фермента. Однако образование комплексов марганца с хелатирующими агентами значительно снижает редокс-потенциал комплекса по сравнению с потенциалом пары $\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{3+}$.

На рис. 1 представлена циклическая вольтамперограмма, записанная с помощью стеклоуглеродного электрода в 0,1 М Na-тарtratном буферном растворе, содержащем 0,2 мМ Mn^{2+} . При сканировании потенциала в область положительных значений на анодной ветви кривой наблюдался процесс окисления при потенциале максимума тока ($E_{p.a.}$), равном 990 мВ. На катодной ветви кривой также присутствует максимум тока ($E_{p.c.}$) при потенциале 890 мВ. Разность потенциалов между пиками окисления и восстановления (ΔE) соответствует 100 мВ, что свидетельствует о протекании на электроде квазиобратимого процесса окисления-восстановления хелатированных ионов Mn. При этом рассчитанный потенциал средней точки, равный 930 мВ, приблизительно соответствует окислительно-восстановительному потенциалу тарtratных комплексов пары $\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{3+}$. При более положительных потенциалах наблюдается некоторое необратимое окисление аквакомплекса ионов Mn^{2+} вплоть до потенциала 1510 мВ. По-видимому, существует равновесие между ионами марганца в составе водного

комплекса и ионами металла, хелатированными тарtrat-анионами, и только последние могут принимать участие в ферментативной реакции. При этом равновесие смещено в сторону водного комплекса ионов марганца. Таким образом, полученное экспериментальным путем значение редокс-потенциала тарtratных комплексов Mn^{2+} указывает на термодинамическую возможность их медленного окисления высокопотенциальными Lcs базидиальных грибов. Для проверки данного предположения была изучена реакция ферментативного окисления Mn^{2+} , катализируемая Lc гриба *T. pubescens* в присутствии хелатирующих агентов (тарtrата и оксалата).

На рис. 2, а приведены спектры образования Mn^{3+} -тарtratного комплекса, измеренные через определенные интервалы времени в процессе ферментативного окисления Mn^{2+} . На присутствие Mn^{3+} -тар-

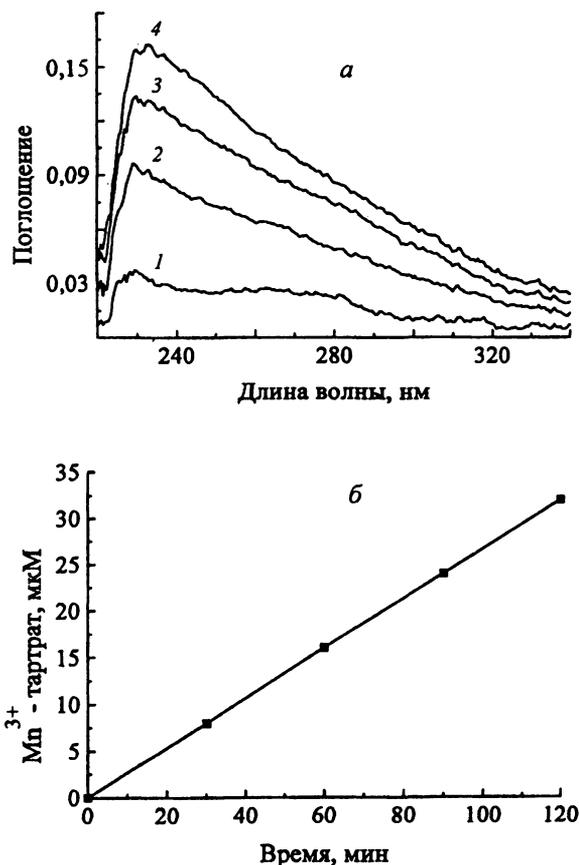


Рис. 2. а – Изменение спектров поглощения во времени (ч) при образовании Mn^{3+} -тарtratного комплекса в результате ферментативного окисления Mn^{2+} лакказы *T. pubescens*: 1 – начальный момент времени; 2 – 2; 3 – 4; 4 – 6 ($1 \cdot 10^{-7}$ М Lc, 0,1 мМ MnSO_4 , 0,1 М Na-тарtratный буфер pH 5,0); б – зависимость скорости образования Mn^{3+} -тарtratного комплекса от времени при ферментативном окислении Mn^{2+} лакказы *T. pubescens* ($1 \cdot 10^{-7}$ М Lc, 0,1 мМ MnSO_4 , 0,1 М Na-тарtratный буфер pH 5,0)

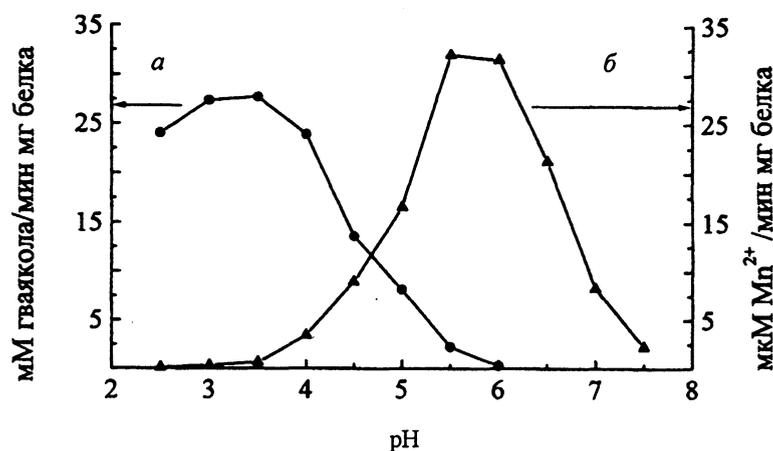


Рис. 3. pH-Зависимость реакций окисления гваякола (а) и Mn^{2+} (б) лакказы базидиомицета *T. pubescens* (10 мМ гваякол, $6 \cdot 10^{-9}$ М Lc, 0,1 М Na-цитрат-фосфатный буфер pH 4,5; 2мМ $MnSO_4$, $4,8 \cdot 10^{-8}$ М Lc, 0,1 М Na-тарtratный буфер pH 5,0; 20°C)

ратного комплекса указывает специфический максимум поглощения при 238 нм [18]. Скорость ферментативного окисления ионов Mn^{2+} невелика, поэтому реакцию проводили в течение длительного времени. Зависимость увеличения оптического поглощения продукта реакции от времени представлена на рис. 2, б. С увеличением времени реакции наблюдается отклонение от линейной зависимости, что можно объяснить нестабильностью образующегося продукта ферментативной реакции – комплекса трехвалентного марганца с тарtrat-ионами. Аналогичные зависимости наблюдались и при использовании высоко редокс-потенциальной Lc базидиомицета *T. hirsuta* со значением редокс-потенциала Г1-центра 780 мВ [22].

Исследование зависимости начальной скорости гомогенной каталитической реакции от концентрации Mn^{2+} в стационарных условиях показало, что кинетика реакции хорошо описывается классическим уравнением Михаэлиса-Ментен. Однако эффективность ферментативного процесса ($k_{кат}/K_m = 0,043 \text{ мМ}^{-1}\text{с}^{-1}$) при окислении Mn^{2+} в присутствии тарtrата существенно ниже, чем при окислении традиционных субстратов лакказ: синингалдазина, АБТС, пирокатехина и $K_3Fe(CN)_6$ [1].

Исследованы pH-зависимости окисления Lc базидиомицета *T. pubescens* органического (гваякол) и неорганического (Mn^{2+}) субстратов. Необходимо отметить, что оптимум pH окисления гваякола расположен в более кислой области pH (3–3,5), в то время как оптимум pH окисления Mn^{2+} до Mn^{3+} сдвинут в нейтральную область и находится в интервале pH 5,5 – 6,0

(рис. 3). При этом скорость окисления гваякола, который является типичным фенольным субстратом лакказы, почти на четыре порядка выше скорости окисления Mn^{2+} – нетрадиционного субстрата грибных Lc.

Было установлено, что ферментативное окисление Mn^{2+} в присутствии Lc из *T. pubescens* и оксалата или тарtrата в качестве хелатирующих агентов сопровождалось образованием пероксида водорода. Об этом свидетельствует реакция окисления АБТС, катализируемая LiP из того же базидиального гриба после удаления Lc из реакционной смеси в результате ультрафильтрации. Кроме того, удалось обнаружить присутствие супероксиданион радикала по восстановлению нитросинего тетразолия в системе, содержащей Lc, Na-оксалатный или Na-тарtratный буфер и ионы Mn^{2+} . Участие супероксиданион радикала во вторичных химических реакциях приводит к образованию пероксида водорода.

В реакционной смеси, содержащей Lc, MnP , Mn^{2+} и хелатор (тарtrat) без добавления H_2O_2 , наблюдалось резкое увеличение скорости образования комплекса Mn^{3+} с тарtrat анионом (рис. 4, кривая 1). В отсутствие Lc эта реакция не протекает (рис. 4, кривая 3). Таким образом, Lc действительно является инициатором MnP - и LiP -реакций.

В результате проведенных исследований изучена реакция окисления ионов Mn^{2+} , катализируемая Lc базидиомицета *T. pubescens* в присутствии хелатирующих агентов (тарtrата и оксалата). Аналогичные результаты были получены с использованием Lc из другого базидиального гриба *T. hirsuta*. Можно пред-

5. Bourbonnais R., Paice M.G. // FEBS Lett. 1990. **267**. P. 99.
6. Eggert C., Temp U., Dean J.F.D., Eriksson K.-E.L. // FEBS Lett. 1996. **391**. P. 144.
7. Hofer C., Schlosser D. // FEBS Lett. 1999. **451**. P. 186.
8. Hofer C., Schlosser D. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. **68**. P. 3514.
9. Dutton M.V., Evans C.S. // Can. J. Microbiol. 1996. **42**. P. 881.
10. Takao S. // Eur. J. Appl. Microbiol. 1965. **13**. P. 732.
11. Popp J.L., Kalyanaraman B., Kirk T.K. // Biochemistry. 1990. **29**. P. 10475.
12. Kuan I.-C., Johnson K.A., Tien M. // J. Biol. Chem. 1993. **268**. P. 20064.
13. Tombs M.P., Akroy D.P. // Shandon Instr. Appl. 1967. **18**. P. 1.
14. Vesterberg O., Svensson H. // Acta Chem. Scand. 1966. **20**. P. 820.
15. Schneider P., Caspersen M.B., Mondorf K., Halkier T., Skol L.K., Ostergaard P.R., Brown K.M., Brown K.M., Xu F. // Enz. Microb. Technol. 1999. **25**. P. 502.
16. Королева О.В., Явметдинов И.С., Шлеев С.В., Степанова Е.В., Гаприлова В.П. // Биохимия. 2001. **66**. С. 618.
17. Tien M., Kirk T.K., Bull C., Feel J.A. // J. Biol. Chem. 1986. **261**. P. 1687.
18. Paszczynski A., Grawford R.L., Huynh V.-B. / Methods Enzymol. **161** (Eds. W.A. Wood and S.T. Kellogg). N.Y., 1988. P. 264.
19. Henriksson G., Johansson G., Pettersson G. // J. Biotechnol. 2000. **78**. P. 93.
20. Bielski B.H., Shiue G.G., Bajuk S. // J. Phys. Chem. 1980. **364**. P. 233.
21. Ehresmann B., Imbault P., Well J.H. // Anal. Biochem. 1973. **54**. P. 454.
22. Shleev S.V., Morozova O.V., Nikitina O.V., Gorshina E.S., Rusinova T.V., Serezhenkov V.A., Burbaev D.Sh., Gazaryan I.G., Yaropolov A.I. // Biochimie. 2004. **86**. P. 693.
23. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. М., 1979. С. 480.

Поступила в редакцию 26.05.05

A ROLE OF MN^{2+} IN THE FUNCTIONING OF LIGNINOLYTIC ENZYMES FROM *TRAMETES PUBESCENS* BASIDIOMYCETE

O.V. Nikitina, S.V. Shleev, E.S. Gorshina, T.V. Rusinova, A.I. Yaropolov

(A.N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences)

In this work a scheme of the interaction between ligninolytic enzymes (laccases, lignin peroxidase, and manganese peroxidase) from basidiomycete *Trametes pubescens* was suggested. A role of the enzymatic oxidation of bivalent manganese ions catalyzed by *Trametes pubescens* laccase in the presence of chelating agents (tartrate and oxalate) in the functioning of the enzymes of ligninolytic complex was shown.