

УДК 579.66

## АМИЛАЗНАЯ И ОКСИДОРЕДУКТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКОДЕСТРУКТОРА *ASPERGILLUS TERREUS* ПРИ ЕГО РОСТЕ НА НОВЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛАХ

© 2010 г.

*И.В. Стручкова, Е.С. Лазарева, В.Ф. Смирнов*

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

protectfun@mail.ru

Поступила в редакцию 05.06.2009

Определена активность экстрацеллюлярных ферментов (амилазы, каталазы, пероксидазы, фенолоксидазы) микромицета *Aspergillus terreus* в процессе биодegradации им новых ПВХ-содержащих полимерных композиций. Показано, что ее уровень для всех перечисленных ферментов зависит от состава композиции. Обсуждаются возможные механизмы этой зависимости и их связь с процессом биодеструкции.

*Ключевые слова:* полимеры, ПВХ, микодеструкция, *Aspergillus terreus*, амилаза, пероксидаза, каталаза, фенолоксидаза.

### Введение

Микроскопические грибы принимают активное участие в биодegradации синтетических и природных полимеров, причем направление и интенсивность процесса деструкции определяются как составом материала, так и физиолого-биохимическими особенностями конкретного вида деструктора. *Aspergillus terreus*, являющийся микромицетом-полифагом, способен активно разрушать как природные, так и синтетические полимеры, что связано с наличием у него широкого круга экзоферментов [1]. С одной стороны, данные агрессивные экзometаболиты способны расщеплять связи между химическими группировками в полимерных соединениях, а с другой – повышать устойчивость микромицетов к внешним стрессирующим воздействиям. Возрастание активности экзоферментов в присутствии полимера обычно вызывается усилением их синтеза *de novo* в результате воздействия специфических индукторов, находящихся в составе материала, либо под влиянием присутствующих в нем активаторов, а также веществ, способных усилить их транспорт из гиф [2].

Биостойкость и биоразлагаемость различных полимерных материалов является важной эколого-технологической проблемой [3]. Большинство синтетических полимеров малоприспособно для вторичного использования, при этом их разложение в природных условиях требует длительного времени. Все крупные производители полимерной продукции в настоящее время разрабатывают экологически безопасные стратегии

утилизации полимерных отходов. Одна из них заключается в создании биоразлагаемых материалов на основе смесевых композиций природных и синтетических полимеров [4].

В рамках работ по созданию новых биоразлагаемых полимерных материалов нами исследовалась активность внеклеточных амилазы, каталазы, пероксидазы и фенолоксидазы микромицета *Aspergillus terreus* в присутствии ПВХ-содержащих композиционных материалов, включающих также природные полимеры. Данные материалы были впервые синтезированы в НИИХ ННГУ [5].

### Экспериментальная часть

Объектом исследования являлся штамм *Aspergillus terreus* ВКМ F-1025, который выращивали на обедненной по углероду питательной среде Чапека (ОПС), содержащей (г/л): сахара – 1.0,  $K_2HPO_4$  – 0.3,  $KH_2PO_4$  – 0.7,  $NaNO_3$  – 2.0,  $KCl$  – 0.5,  $MgSO_4$  – 0.5,  $FeSO_4$  – 0.0002. На четвертые сутки культивирования в опытные варианты дополнительно вводили полимерные композиции в количестве 10 г/л среды. Каждый состав представлял собой ПВХ, пластифицированный диоктилфталатом и сочетавшийся с одним из четырех видов полимерных материалов: хитозаном, крахмалом, сосновыми опилками или этилметилцеллюлозой. Соотношение «ПВХ : природный полимер» составляло 1 : 0.2 и 1 : 0.5 в различных составах.

Активность ферментов определяли спектрофотометрически на 10-е сутки культивирования

в культуральной жидкости [6]. Определение активности каталазы проводили по убыли субстрата (3.5%  $H_2O_2$ ) при  $\lambda_{max} = 240$  нм. Активность пероксидазы измеряли при  $\lambda_{max} = 535$  нм, используя в качестве субстрата 0.03%  $H_2O_2$  и 1.8% парафенилендиамин. Определение активности фенолоксидазы проводили при  $\lambda_{max} = 535$  нм по прибыли продукта, используя в качестве субстрата парафенилендиамин. Общую амилазную активность определяли по убыли субстрата (крахмала, 1%-ный раствор), о которой судили по уменьшению оптической плотности крахмал-йодного комплекса ( $\lambda_{max} = 640$  нм).

За единицу активности ферментов принимали: для каталазы – убыль оптической плотности в 1 мл реакционной смеси за 1 час, для пероксидазы и фенолоксидазы – приращение оптической плотности в 1 мл реакционной смеси за 1 час, для амилазы – количество мг крахмала, гидролизованного за 1 час. Результаты измерений пересчитывали на 1 мг экстрацеллюлярного белка. Экстрацеллюлярный белок определяли по методу Лоури.

Все опыты проводили в трёх биологических повторностях. Для оценки достоверности различий использовали критерий Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

Результаты исследований активности экзоферментов *Aspergillus terreus* при росте на раз-

личных ПВХ-содержащих полимерных материалах представлены на рис. 1 и 2.

Исходя из химического состава новых полимеров и опираясь на имеющиеся литературные данные об аналогичных составах и отдельных компонентах [4, 7], мы предполагали, что каталаза и пероксидаза способны участвовать в деградации ПВХ-материалов, а также древесины (опилки). Фенолоксидаза может играть важную роль в процессе метаболизации лигнина древесины. Амилаза способна активно участвовать в биоутилизации композиций, содержащих в своем составе крахмал.

При изучении активности оксидоредуктаз установлено (рис. 1), что наличие хитозансодержащей ПВХ-композиции в среде роста максимально повышает как каталазную, так и пероксидазную активность – соответственно в 3.7 и 1.7 раза по сравнению с контролем (то есть вариантом, где средой культивирования являлась ОПС без внесения материала). Активность фенолоксидазы в присутствии этого природного полимера, напротив, резко снижается. Введение в полимерные материалы крахмала или опилок дает обратную картину: активность каталазы и пероксидазы падает, фенолоксидазы – увеличивается. Наличие в материале этилметилцеллюлозы приводит к двукратному падению активности пероксидазы, одновременно увеличивая активность каталазы и фенолоксидазы – в 2.5 и 1.3 раза соответственно.

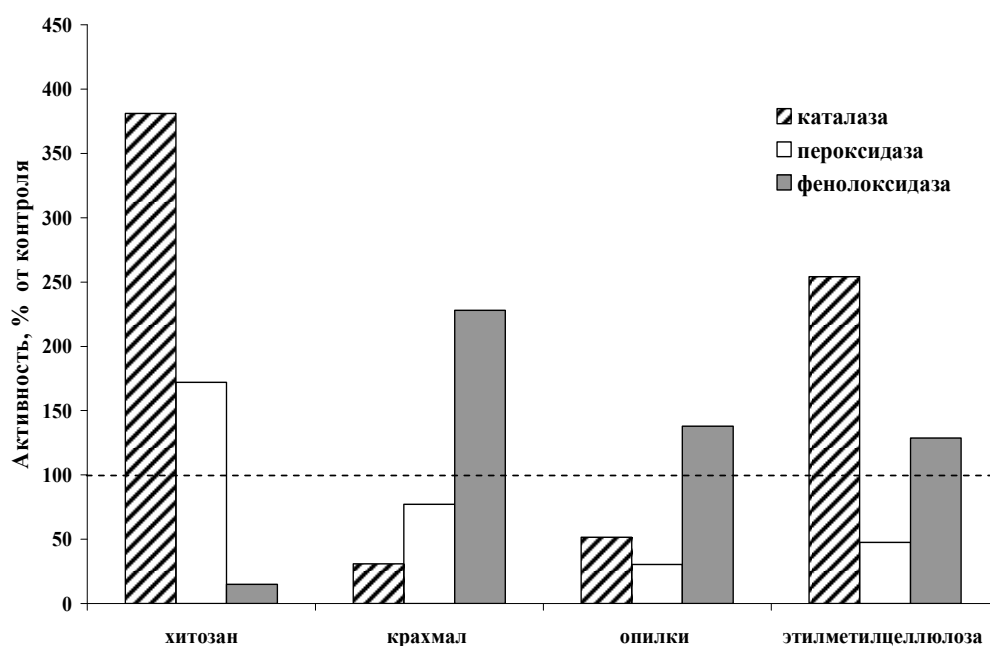


Рис. 1. Оксидоредуктазная активность *A. terreus* при росте на ПВХ-содержащих материалах ( $p < 0.05$ ). Пунктиром обозначен уровень контроля (ОПС)

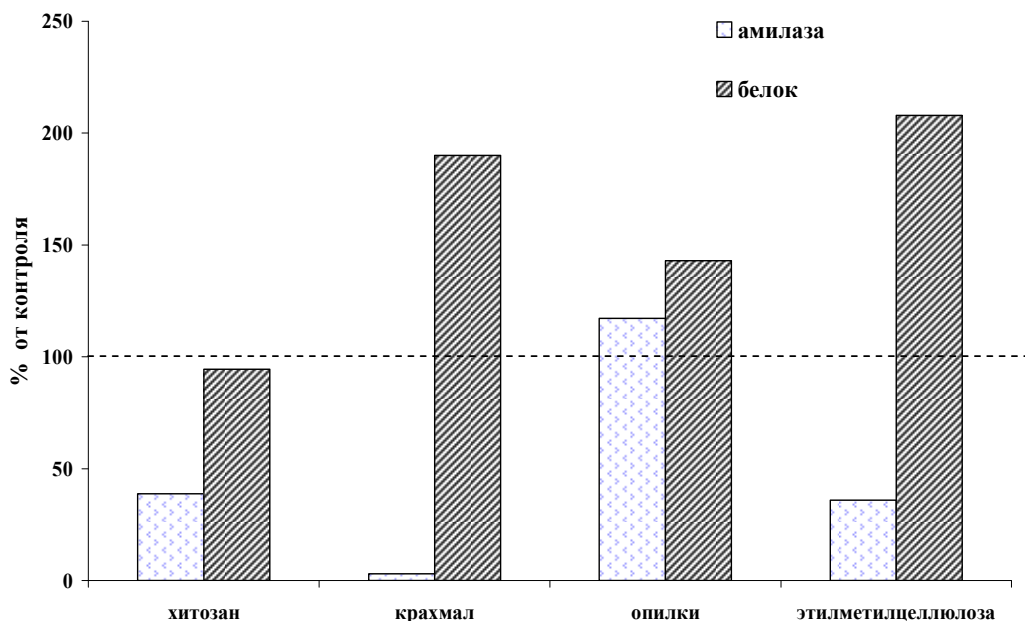


Рис. 2. Оксидоредуктазная активность *A. terreus* при росте на ПВХ-содержащих материалах ( $p < 0,05$ ). Пунктиром обозначен уровень контроля (ОПС)

Данные об общей амилазной активности *A. terreus* в присутствии различных ПВХ-материалов представлены на рис. 2.

По сравнению с контролем общая амилазная активность уменьшалась в 3 раза, если компонентами ПВХ-композиции являлись хитозан или этилметилцеллюлоза. Если ПВХ в материале сочетался с опилками, общая амилазная активность в среде культивирования несколько увеличивалась (на 20%), а при сочетании ПВХ с крахмалом отмечалось практически полное ее ингибирование.

Сопоставление данных об активности исследуемых ферментов с данными о концентрации суммарного белка, выделяемого в среду, обеспечивает более точное представление о перестройках метаболизма, идущих в мицелии при добавлении ПВХ-композиций. Зависимость накопления экстрацеллюлярного белка от компонента, добавляемого к ПВХ, отражена на рис. 2. Присутствие хитозана в композите не приводило к статистически достоверному изменению рассматриваемого показателя по сравнению с контролем, тогда как наличие в материале опилок увеличивало его в 1.4 раза, этилметилцеллюлозы или крахмала – приблизительно в 2 раза.

В целом, активность всех четырех изучавшихся нами ферментов, а также количество внемицелиального белка изменялись при смене наполнителя ПВХ в материале, добавляемом в среду, однако характер каждой зависимости был уникален.

Известно, что ПВХ является трудноутилизируемым грибами материалом [3], для расщепления которого они секретируют оксидоредуктазы. Микробиологические испытания [5] показали, что среди изучавшихся нами ПВХ-композиций только состав с хитозаном способен обеспечить развитие мицелия *A. terreus* в качестве единственного источника питания. ПВХ-материалы с крахмалом, опилками и этилметилцеллюлозой не поддерживают рост гриба, то есть создают экстремальные условия, не совместимые с нормальной жизнедеятельностью данного микроорганизма. В наших экспериментах гриб дополнительно снабжался минимумом углеродного источника (ОПС, 1 г/л сахарозы), что и обеспечило возможность его существования на всех указанных материалах.

Грибоустойчивость большинства перечисленных ПВХ-содержащих композиций, выявленная в микробиологических испытаниях [5], позволяет предположить присутствие в поливинилхлоридном компоненте каких-то ингредиентов, оказывающих токсическое действие на жизнедеятельность микроорганизмов и, в связи с этим, способных ингибировать их экзоферменты. Такими токсичными компонентами могут являться, например, соли некоторых тяжелых металлов, фенольные компоненты и ряд других соединений, применяемых в процессе производства ПВХ [8]. Степень высвобождения из материала подобного токсичного компонента

будет зависеть от химического состава полимерной композиции. Полисахариды обладают способностью связывать токсичные вещества, но эта способность варьирует в зависимости от их химического строения. Хитозан, известный как высокоэффективный адсорбент разнообразных токсичных соединений [9], находясь в составе ПВХ-композиции и связывая предполагаемый токсичный компонент ПВХ, способен снизить степень его негативного воздействия на метаболизм микромицета. В нашем случае этим можно объяснить повышение по сравнению с контролем активности каталазы и пероксидазы в присутствии хитозансодержащей ПВХ-композиции. Отмечаемое при этом преобладание каталазной активности указывает на меньшую чувствительность каталазы к предполагаемому токсичному компоненту по сравнению с пероксидазой.

Этилметилцеллюлоза в сочетании с ПВХ, вероятно, снижает концентрацию токсичной примеси в меньшей степени, чем хитозан. Токсичный компонент, воздействуя на более чувствительную к нему пероксидазу, вызывает падение ее активности ниже уровня, наблюдаемого в контроле. Ингибирующее влияние на каталазу менее выражено: активность фермента, сниженная по сравнению с вариантом «ПВХ : хитозан», тем не менее, превосходит контрольный уровень. Резкое снижение активности каталазы и пероксидазы на материалах «ПВХ : крахмал» и «ПВХ : опилки» можно объяснить большей степенью воздействия на эти ферменты предполагаемого токсичного компонента из-за меньшего его связывания композициями.

Крахмал является естественным субстратом и индуктором амилаз. В связи с этим можно было ожидать значительное возрастание экзoамилазной активности при росте *A. terreus* в присутствии материала «ПВХ : крахмал» и, как следствие работы экзoфермента, высокую степень доступности для гриба данного материала. Однако наличие названной композиции в среде роста привело к падению амилазной активности, еще более выраженному, чем для каталазы и пероксидазы, а также к усилению накопления экстрацеллюлярного белка (рис. 2). Вероятно, под действием токсичного компонента материала «ПВХ : крахмал» происходит не только ингибирование всех трех ферментов, но и выход белков из мицелия в результате его частичного лизиса. Аналогичное объяснение снижения амилазной активности при возрастании выхода белков можно предложить для варианта, в котором использовался материал «ПВХ : этилметилцеллюлоза». Меньшая чем в присутствии

материала «ПВХ : крахмал», степень ингибирования амилаз соответствует нашему предположению о большем связывании токсичного компонента ПВХ-композицией, содержащей этилметилцеллюлозу.

Роль фенолоксидаз в метаболизме микромицетов связывают как с их участием в деградации фенолсодержащих соединений – источников питания, так и с процессами активации адаптационных механизмов гриба в стрессовых условиях – синтезом меланинов, детоксикацией ксенобиотиков и некоторыми другими [10, 11]. Можно предположить, что в случае ПВХ-полимеров их функции аналогичны. Увеличение фенолоксидазной активности выше контрольного уровня наблюдалось в присутствии лишь грибобстойких ПВХ-материалов – при усилении накопления экстрацеллюлярного белка. Если при деструкции материала «ПВХ : опилки» возрастание активности фенолоксидазы можно объяснить индукцией синтеза фермента мономерами лигнина – фенольными спиртами, то в двух других случаях трудноутилизуемых составов фермент, видимо, индуцируется в ответ на действие стрессовых условий – соединениями фенольной природы, высвобождающимися при лизисе отмирающих зон мицелия.

Мы установили, что введение в состав среды культивирования *A. terreus* ПВХ-композиций с различными природными полимерами способно приводить к образованию грибом разного в количественном и качественном отношении спектра агрессивных для материала экстрацеллюлярных ферментов. В присутствии материала «ПВХ : хитозан» по сравнению с контролем возрастает активность экстрацеллюлярных каталазы и пероксидазы, что дает возможность разрушения ими ПВХ – синтетического компонента этого материала. В связи с выявленным нами усилением ферментативной активности, для композиции «ПВХ : этилметилцеллюлоза» в деструкции ПВХ-компонента возможно участие каталазы. В присутствии любого из трудноутилизуемых ПВХ-композиций возрастает активность фенолоксидазы.

В то же время следует отметить, что измерения в нашем исследовании проводились лишь в одной временной точке – на 10-е сутки роста гриба. Исходя из теории диауксического роста микроорганизмов, низкая активность каких-либо ферментов на данном этапе метаболизации многокомпонентного субстрата не означает, что эти ферменты не будут участвовать в деструкции синтетической части композиции при исчерпании более легкоутилизуемых природных полимеров.

### Заключение

Рост грибов на полимерных композициях обусловлен тем, что последние используются микроорганизмами в качестве источников питания. Изменение ферментативной активности при введении различных полимерных материалов в среду культивирования позволяет оценить как метаболический статус микодеструктора, так и интенсивность деструкционного процесса, в котором данные ферменты принимают участие. В наших исследованиях показано, что уровень активности каталазы, пероксидазы, фенолоксидазы и амилазы *A. terreus* в присутствии ПВХ-композиций изменяется при смене природного полимера, вводимого в материал, что представляет значительный интерес в плане дальнейшей разработки ПВХ-материалов с регулируемой биостойкостью.

*Работа выполнена при финансовой поддержке АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы (2009–2010 годы)», проект № 1056.*

#### Список литературы

1. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов. М.: Изд-во МГУ, 1988. 230 с.
2. Безбородов А.М., Астапович Н.И. Секрция ферментов у микроорганизмов. М.: Наука, 1984. 72 с.
3. Смирнов В.Ф., Веселов А.П., Семичева А.С. Экологические и биологические аспекты деструкции промышленных материалов микроорганизмами. Н. Новгород: Изд-во ННГУ, 2002. 150 с.
4. Васнев В.А. Биоразлагаемые полимеры // Высокомолек. соед. Сер. Б. 1997. Т. 39. № 12. С. 2073–2086.
5. Кряжев Д.В., Смирнов В.Ф., Смирнова О.Н. и др. Устойчивость композиционных материалов на основе синтетических и природных полимеров к действию микромицетов в природных условиях // Поволжский экологический журнал, 2010, в печати.
6. Методы экспериментальной микологии / Под ред. В.И. Билай. Киев: Наукова думка, 1982. 453 с.
7. Наплекова Н.Н., Абрамова Н.Ф. О некоторых вопросах механизма воздействия грибов на пластмассы // Известия СО АН СССР. Сер. Биология. 1976. № 3. С. 21–27.
8. Виксон Э.Д., Гроссман Р.Ф. Руководство по разработке композиций на основе ПВХ. СПб.: Изд-во НОТ, 2009. 608 с.
9. Федосеева Е.Н., Алексеева М.Ф., Нистратов В.П., Смирнова Л.А. Особенности механических испытаний пленок хитозана // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2009. Т. 75. № 7. С. 22–26.
10. Thurston C.F. // Microbiology. 1994. V. 140. P. 19–26.
11. Головлева Л.А., Мальцева О.В. Биохимия разложения лигнина микроорганизмами. М.: Наука, 1987. 254 с.

### AMYLASE AND OXIDOREDUCTASE ACTIVITY OF MYCODESTRUCTOR *ASPERGILLUS TERREUS* WHEN GROWING ON NEW POLYMER MATERIALS

*I.V. Struchkova, E.S. Lazareva, V.F. Smirnov*

The activity has been determined of extracellular enzymes (amylase, catalase, peroxidase, phenoloxidase) of mycodestructor *Aspergillus terreus* in the process of its biodegradation of new PVC polymers with different fillers. The activity level for all enzymes has been shown to depend mostly on the filler type. Possible mechanisms of this dependence and their relation to the biodestruction process are discussed.

*Keywords:* polymers, PVC, mycodestruction, *Aspergillus terreus*, amylase, peroxidase, catalase, phenoloxidase.