

УДК 535.518; 547.588

БИОДЕСТРУКЦИЯ ЭФИРОВ ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ ГРИБАМИ БЕЛОЙ ГНИЛИ

А.В. Шабаев¹, О.С. Савинова¹, С.А. Еремин^{1,2}, Т.В. Федорова¹¹ – Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия² – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Сложные эфиры фталевой кислоты (ЭФК, фталаты) широко распространены в окружающей среде как результат их широкого использования в качестве пластификаторов и добавок при изготовлении различных потребительских товаров [Giuliani et al., 2020]. В настоящее время растет озабоченность по поводу их стойкости и токсичности. По структуре эти соединения напоминают эстроген (рис. 1) и потенциально могут нарушать функционирование эндокринной системы животных и человека, отрицательно влияя на развитие и репродуктивную функцию [Wang&Qian, 2021].

Экологически приемлемым способом их биодеструкции является применение ферментов микроорганизмов. В настоящее время активно изучаются механизмы бактериальной биодеструкции соединений ЭФК, в то время как исследованию биодеструкции фталатов базидиальными грибами уделяется гораздо меньше внимания.

В данном исследовании мы оценивали скорость биодеструкции соединений ЭФК разной структуры и гидрофобности (ДЭФ – диэтилфталат; ДЭГФ – диэтилгексил фталат; ДБФ – дибутилфталат; ДиБФ – диизобутилфталат и ББФ – бензилбутилфталат) (рис. 1) базидиальными грибами белой гнили из разных экофизиологических групп: дереворазрушающие сапротрофы, произрастающие на древесине разной степени разрушенности – *Trametes hirsuta* LE-BIN 072, *Peniophora lycii* LE-BIN 2142 и *Steccherinum ochraceum* LE-BIN 3174; подстилочный сапротроф – *Crucibulum laeve* LE-BIN 1700.

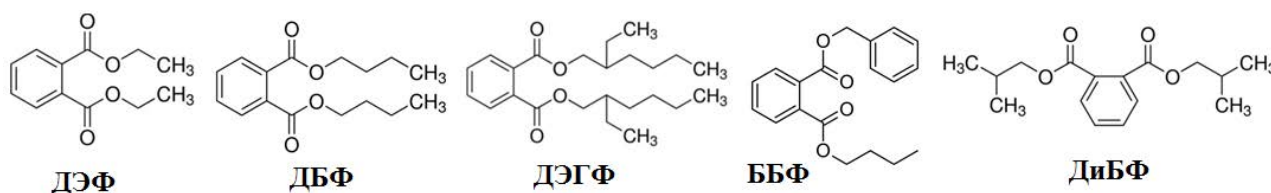


Рисунок 1. Формулы сложных эфиров фталевой кислоты (ЭФК)

Штаммы грибов культивировали в жидкой минеральной среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 0,6; K_2HPO_4 – 0,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CaCl_2 – 0,05; MnSO_4 – 0,05; ZnSO_4 – 0,001; FeSO_4 – 0,0005; NaNO_3 – 3,0; глюкозы – 10,0; Tween 80 – 0,2. В стерильную минеральную среду в асептических условиях вносили ЭФК из расчета 1 г/л и 10 г. сырой грибной биомассы, предварительно выращенной на глюкозо-пептонной среде (состав аналогичен минеральной среде за исключением NaNO_3 , вместо которого добавляют 3,0 г/л пептона). В процессе культивирования грибных культур в культуральной жидкости (КЖ) определяли оксидазную и эстеразную ферментативные активности, а также содержание ЭФК. Грибную биомассу в ходе культивирования отделяли фильтрованием и высушивали при температуре $(100 \pm 5)^\circ\text{C}$ до постоянной массы.

Оксидазную активность регистрировали спектрофотометрическим методом при длине волны $\lambda = 436$ нм с использованием АБТС в качестве хромогенного субстрата ($\epsilon = 29500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Реакционная смесь состояла из 2 мл раствора 10 мМ АБТС в 0,1 М натрий-ацетатном буфере (pH 4,5), и 100 мкл культуральной жидкости. Увеличение оптической плотности регистрировалось в течение 3 минут. За условную единицу ферментативной активности принимали увеличение оптической плотности в 1 мл реакционной среды за 1 мин.

Эстеразную активность определяли спектрофотометрически, используя п-нитрофенил бутират в качестве субстрата. Реакцию проводили в натрий ацетатном буфере (pH 4,5) при 40°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали натрий фосфатным буфером (pH 7,3), оптическую плотность определяли при длине волны $\lambda = 400$ нм.

Содержание ЭФК в процессе культивирования грибов белой гнили проводили с использованием метода газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС). Для чего получали гексановые экстракты образцов культуральных жидкостей (1:1 об./об.) и анализировали в двух режимах – регистрация ионных масс в полном спектре (диапазон масс m/z 45–400) (TIC) и регистрация по характерному для ЭФК основному иону ($m/z = 149$) (MIS).

Грибные секретомы анализировали методом двумерного гель-электрофореза с идентификацией пятен белков MALDI-TOF-TOF масс-спектрометрией [Moiseenko et al., 2021].

Ранее нами была показана возможность роста базидиальных грибов белой гнили на твердых агаровых средах, содержащих различные концентрации ЭФК, в результате проведенных экспериментов была определена концентрация ЭФК – 1 г/л, которая не приводила к значительному ингибированию роста грибов [Савинова и др., 2022].

Анализ динамики накопления грибной биомассы показал, что при жидкофазном культивировании на минеральной среде, содержащей глюкозу и ДЭГФ происходило увеличение биомассы по сравнению с контрольной средой без ЭФК у таких грибов как *S.ochraceum* и *C.laeve* (рис. 2). В целом *T.hirsuta* и *P.lycii* на средах с ЭФК показали сходную с контролем продукцию биомассы, за исключением среды с ДЭФ, где у всех грибов наблюдалось значительное ингибирование роста, наиболее выраженное у *C.laeve*. На средах с ДБФ, ДиБФ и ББФ у *S.ochraceum* и *C.laeve* отмечено незначительное снижение продукции биомассы по сравнению с контролем.

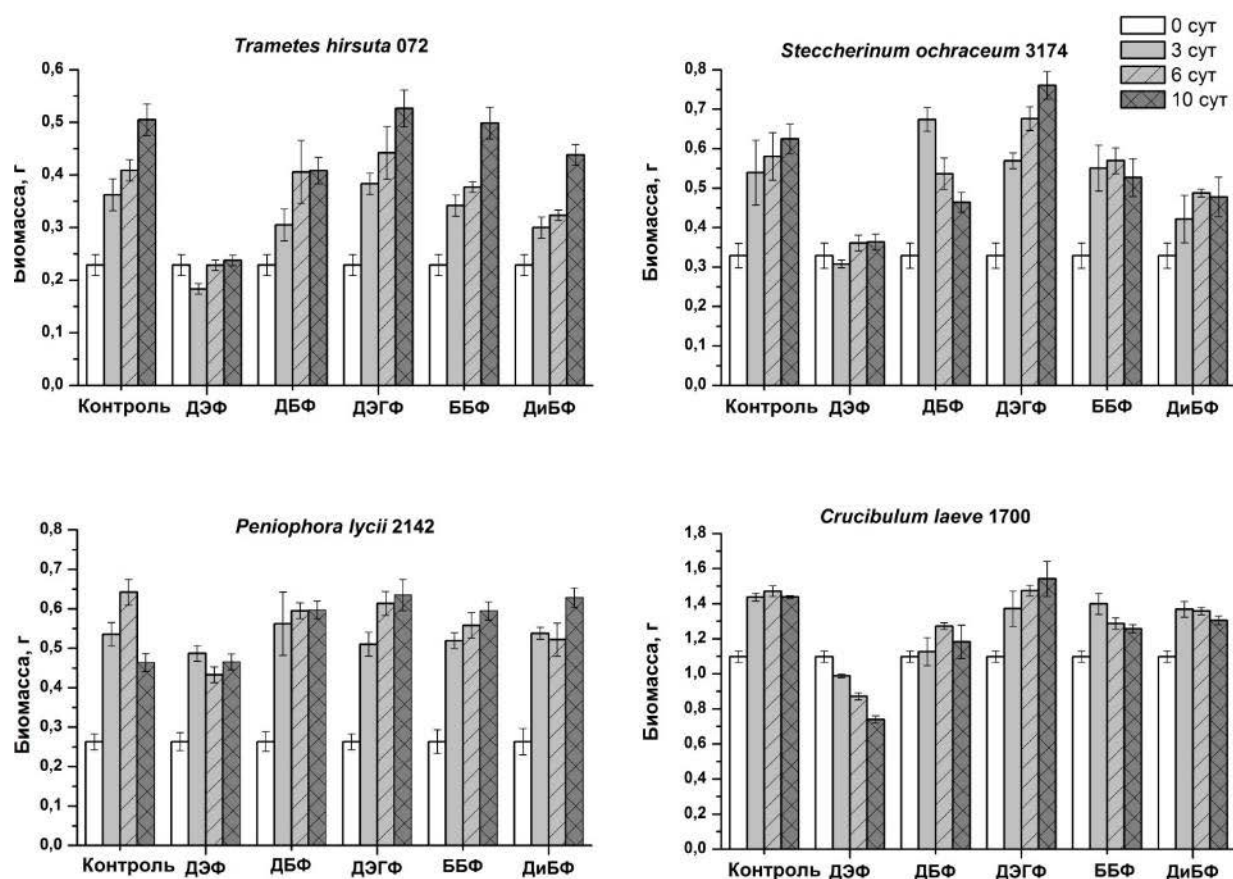


Рисунок 2. Динамика накопления биомассы (по сухому весу) штаммами грибов белой гнили при культивировании на минеральной среде с ЭФК (1 г/л)

Анализ ферментативных активностей (рис. 3) показал, что у *T.hirsuta* в присутствии ЭФК в первые 3 суток культивирования увеличивалась по сравнению с контролем эстеразная активность, а затем происходил постепенный рост оксидазной активности. У *S.ochraceum* и *C.laeve* значительное увеличение оксидазной активности детектировалось только на среде с ДБФ, в присутствии остальных ЭФК отмечено увеличение эстеразной активности. У *P.lycii* на средах с ЭФК оксидазная активность была меньше, чем на контрольной, зато детектировалась самая высокая из всех грибных культур эстеразная активность.

Сравнительное исследование способности различных грибов белой гнили к биодеструкции ЭФК показало, что скорость разложения ДЭФ у всех грибов была значительно ниже, по сравнению с другими ЭФК. Грибные культуры на 30 сутки культивирования до конца не разрушали ДЭФ, в то время как большинство грибов осуществляли биодеструкцию других ЭФК примерно на 80–90 % уже на 10 сутки культивирования. Показано, что соединения ЭФК с более длинными и разветвленными углеводородными звеньями (как-то ДЭГФ, ДиБФ и ББФ) лучше подвергались биодеструкции дереворазрушающими сапротрофами, такими как *T.hirsuta*, *S.ochraceum* и *P.lycii* (рис. 4). В то же время ДБФ с более короткими и менее гидрофобными углеводородными звеньями лучше всего подвергался разрушению подстилочным сапротрофом *C.laeve*.

Самым трудно деградируемым и токсичным ЭФК для грибных культур являлся ДЭФ, что было также показано для таких грибов белой гнили, как *Pleurotus ostreatus* и *Trametes versicolor* [Hwang et al., 2008]. Хотя, как правило, скорость биodeградации фталатов снижается с увеличением длины алкильной цепи и алкильных разветвленных цепей. При этом в нашем исследовании среди изученных грибов *T.hirsuta* показал высокие скорости разложения в отношении всех соединений ЭФК. Не все протестированные грибы обладали высокой способностью к биоразложению всех ЭФК, хотя некоторые из них, оказались очень эффективными для разложения отдельных фталатов. Так штамм *P.lycii* был наиболее эффективным в биодеструкции ДЭГФ, а *C.laeve* в биодеструкции ДБФ.

Анализ секретомов *T.hirsuta* показал, что в присутствии ЭФК увеличивается секреция лигнолитических ферментов данным грибом, таких как марганец пероксидазы (MnP), версатил пероксидаза (VP2), лигнин пероксидаза (LiP9) и лакказы (LacA). Причем в зависимости от конкретного соединения ЭФК это могут быть разные изофермы одного белка. Так на среде с ДиБФ среди идентифицированных белков увеличивалась доля марганец пероксидазы MnP5, а на среде с ББФ – марганец пероксидазы MnP7. Интересно отметить, что на среде с ДЭГФ в секретоме *T.hirsuta* на 10 день культивирования полностью отсутствовала лакказа, что согласуется с низкой оксидазной активностью в КЖ (рис. 3).

Полученные нами результаты показывают, что продукция ферментов грибными культурами зависит от физиологии конкретного штамма, условий культивирования и конкретного субстрата. Такое различное поведение грибов белой гнили может быть связано с продукцией конкретных ферментов, которые индивидуальны для каждого отдельного штамма, что в свою очередь может быть связано с различными путями деструкции фталатов, задействованными в данном процессе. Необходимо провести дальнейшие исследования влияние фталатов на продукцию грибами ферментативного комплекса, чтобы улучшить наши текущие представления о механизмах биоразложения этих соединений различными видами грибов. Понимание фундаментальных аспектов биодеструкции грибами белой гнили имеет решающее значение для выбора культур, способных наиболее эффективно разрушать конкретные соединения ЭФК.

Полученные данные дают основания предположить, что для эффективной биодеструкции ЭФК необходимо использовать ферментативные коктейли, состоящие из ферментов продуцентами которых являются грибы из разных экофизиологических групп. Для идентификации профиля таких ферментов будут продолжены работы по сравнительному анализу секретомов грибов при росте на средах, содержащих различные соединения фталатов.

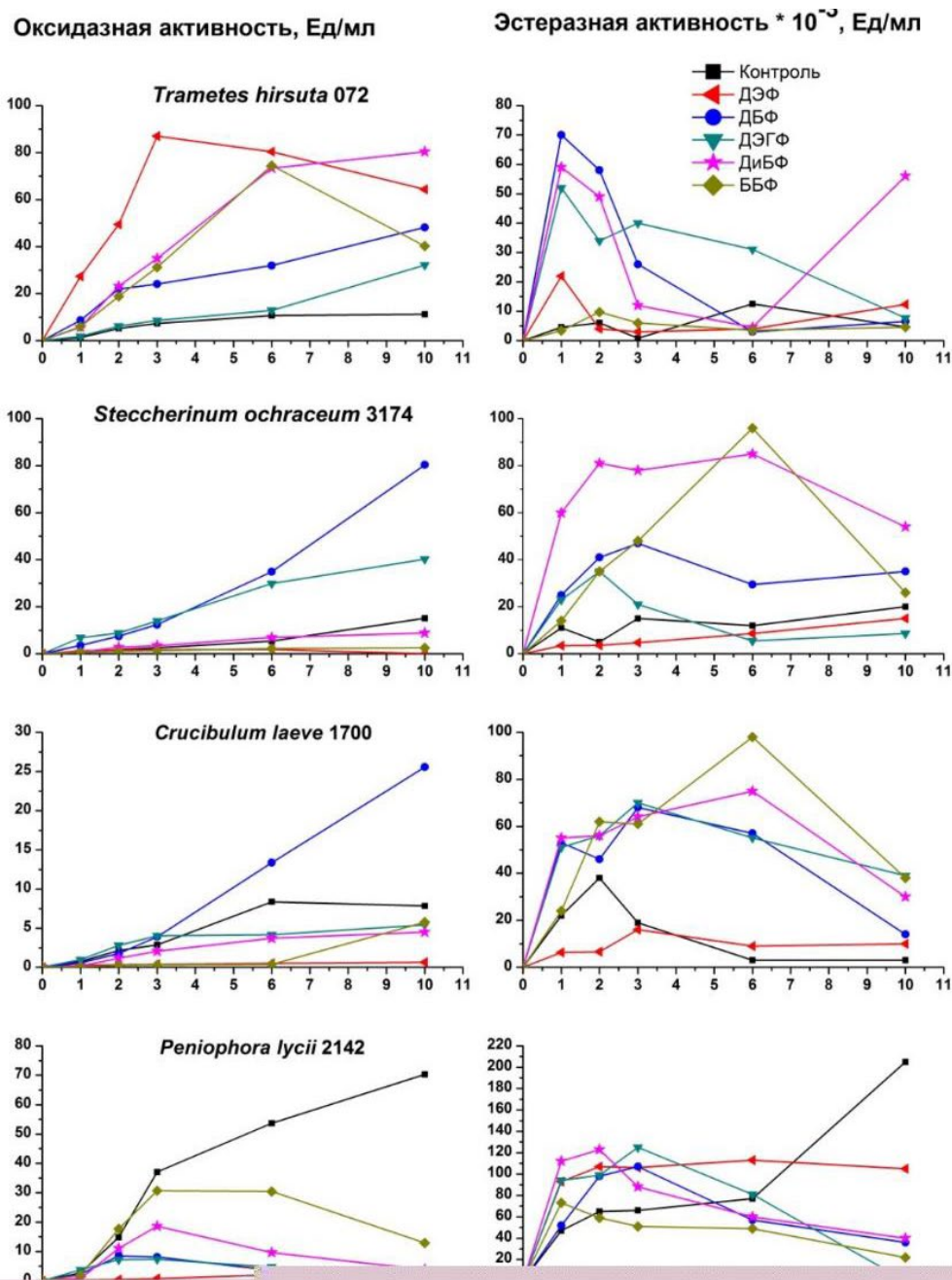


Рисунок 3. Динамика ферментативной активности при культивировании грибов белой гнили на минеральной среде с ЭФК (1 г/л)

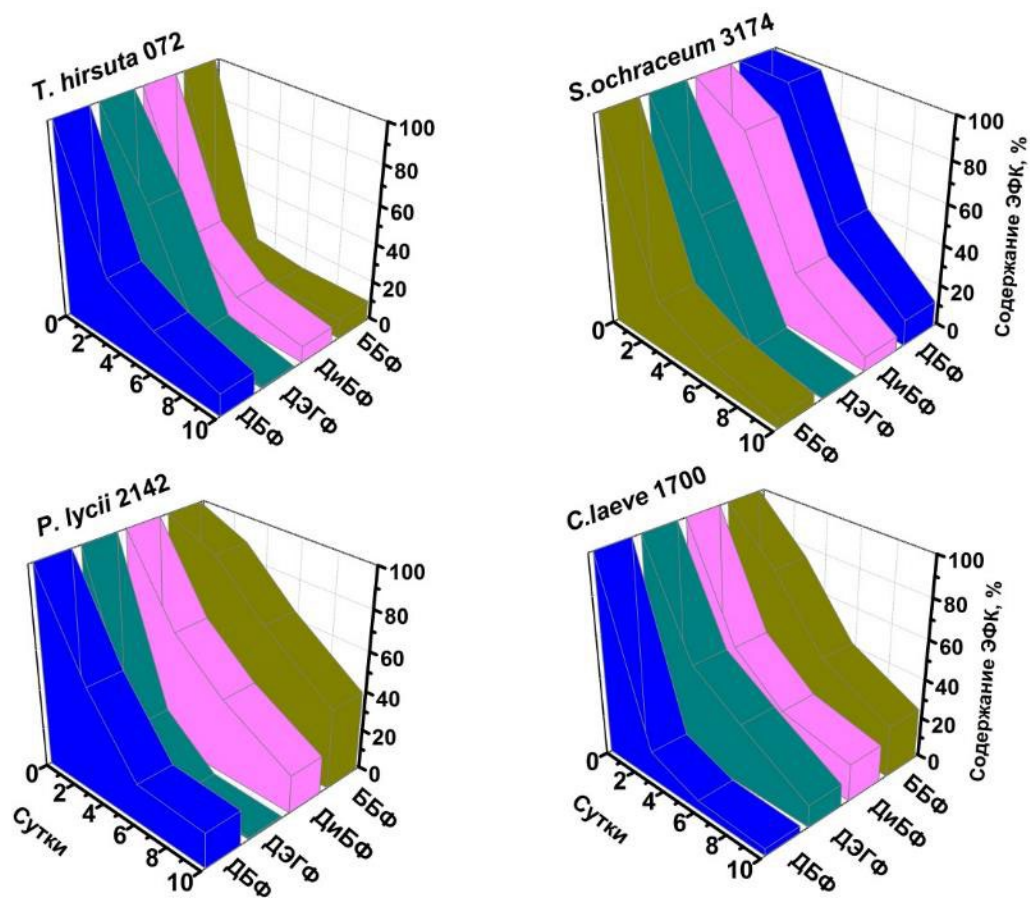


Рисунок 4. Динамика биодеструкции ЭФК (1 г/л) грибами белой гнили

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00306).

Литература

- Giuliani A., Zuccarini M., Cichelli A., Khan H., Reale M. Critical Review on the Presence of Phthalates in Food and Evidence of Their Biological Impact // *Int. J. Environ. Res. Public Health* – 2020. – Vol. 17(16) – 5655; doi:10.3390/ijerph17165655.
- Hwang S. – S., Choi H. – T., Song H. – G. Biodegradation of Endocrine-Disrupting Phthalates by *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008, Vol. 18(4), P. 767–772.
- Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Savinova O.S., Vasina D.V., Kulikova N.A., Fedorova T.V., Zhrebker A.Y., Nikolaev E.N. Relation between lignin molecular profile and fungal exo-proteome during kraft lignin modification by *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 // *Bioresource Technology* – 2021, Vol. 335. – 125229; doi: 10.1016/j.biortech.2021.125229
- Wang Y., Qian H. Phthalates and Their Impacts on Human Health // *Healthcare* – 2021. – Vol. 9(5) – 603; doi:10.3390/healthcare9050603.
- Савинова О.С., Шабает А.В., Глазунова О.А., Еремин С.А., Федорова Т.В. Биодеструкция эфиров фталевой кислоты грибами белой гнили // *Прикладная Биохимия и Микробиология* – 2022. – Т. 58, № 5. – С. 484–499.