

УДК 640

БИОДЕГРАДАЦИОННАЯ СТРАТЕГИЯ ГРИБА БЕЛОЙ ГНИЛИ TRAMETES HIRSUTA 072 В ОТНОШЕНИИ ЭНДОКРИННЫХ РАЗРУШИТЕЛЕЙ – ЭФИРОВ ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ**Т.В. Фёдорова, А.В. Шабаев***Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

Эфиры фталевой кислоты (ЭФК, фталаты) – это сложные эфиры фталевой кислоты, широко используемые для производства мебели, одежды, косметики, детских игрушек, пищевых добавок, упаковки для пищевых продуктов, а также фармацевтических препаратов, медицинских приборов и т. д. [1]. Из-за такого широкого применения, а также сравнительного простого высвобождения в окружающую среду, фталаты являются одними из наиболее распространенных ксенобиотиков, с которыми люди контактируют ежедневно [2]. Попадая в организм человека различными путями, в основном через потребление пищи, воды, вдыхание частиц микропластика, фталаты могут оказывать негативное влияние на здоровье человека разрушая гормоны тем самым негативно влияя на всю эндокринную систему человека [3, 4]. При этом базидиомицеты белой гнили известны как эффективные биодеструкторы различных ксенобиотиков [5, 6]. Учитывая вышеизложенное, изучение способности базидиомицетов белой гнили разлагать фталаты, а также выявление механизмов деструкции фталатов, является крайне актуальной задачей.

Материалы и методы

Штамм базидиомицета *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 был получен из Коллекции культур Ботанического института им. В.Л. Комарова (Санкт-Петербург, Россия). В работе были использованы следующие реактивы: дибутилфталат (ДБФ), бутилбензилфталат (ББФ), диэтилгексилфталат (ДЭГФ) и диизобутилфталат (ДиБФ) фирмы “Sigma-Aldrich” (США). Другие материалы и растворители квалификации “х.ч.” и “ч.д.а.” были приобретены у российских производителей.

Культивирование грибной культуры *T. hirsuta*. Для получения инокулята грибную культуру культивировали на глюкозо-пептонной (ГП) среде следующего состава (г/л): пептон – 3.0; глюкоза – 10; KH_2PO_4 – 0.6; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 0.4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; CaCl_2 – 0.5; $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.05; ZnSO_4 – 0.001; FeSO_4 – 0.0005, при 25 °C в течении 10–14 суток в стационарных условиях.

Для изучения биодеструкционной способности гриба в отношении различных соединений фталатов инокулят измельчали, стерильно вносили в колбы для культивирования в объеме 10 % и проводили жидкофазное культивирование глубинным способом на ГП среде при перемешивании со скоростью 180 об./мин и 27 °C. По окончании культивирования грибные пеллеты отделяли фильтрованием и промывали 0.02 %-ным стерильным водным раствором Твин 80, после чего 10 г. грибной биомассы стерильно переносили в конические колбы на 250 мл со 100 мл жидкой минеральной среды следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 0.6; K_2HPO_4 – 0.4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; CaCl_2 – 0.05; MnSO_4 – 0.05; ZnSO_4 – 0.001; FeSO_4 – 0.0005; NaNO_3 – 3.0; глюкоза – 10.0; Твин 80 – 0.2. Перед внесением грибной биомассы в колбы добавляли растворы ЭФК в концентрации 1.0 г./л, инкубировали на ротаторной качалке при 100 об./мин и 25 °C в течение 10 дней. Для проведения экспериментов по изучению биосорбции соединений фталатов грибным мицелием, пеллеты предварительно инактивировали двумя способами: (1) термостатированием при температуре 55 °C в течение 24 ч и (2) инкубированием пеллет в минеральной среде с добавлением 1 % NaN_3 , после чего в колбы с инактивированным мицелием вносили ЭФК и культивировали, как описано выше. Пробы культуральной жидкости (КЖ) отбирали на 1, 2, 3, 6 и 10 дни культивирования и определяли в них ферментативные активности (общую оксидазную и эстеразную) и остаточное содержание ЭФК с использованием газовой хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ГХ-МС).

Для сравнительного изучения протеомов и секретомов гриба в присутствии различных соединений ЭФК проводили жидкофазное культивирование глубинным способом на минеральной среде в течение 10 дней при перемешивании со скоростью 180 об./мин и 27 °C. По окончании культивирования грибной мицелий отделяли, измельчали и экстрагировали белки. КЖ концентрировали, отмывали от солей диафильтрацией и осаждали белки. Белки мицелия и КЖ разделяли с помощью двумерного электрофореза и идентифицировали с использованием MALDI-TOF-TOF масс-спектрометрического анализа.

Газовая хроматография с масс-спектрометрической детекцией (ГХ-МС). Гексановые экстракты образцов КЖ (1:1 об./об.) анализировали методом газо-жидкостной хроматографии в двух режимах: регистрация ионных масс в полном спектре (TIC, диапазон масс m/z 45–400) и регистрация по характерному для ЭФК основному иону (MIS, m/z = 149 – протонированный фталевый ангидрид). Анализ проводили на газовом хроматографе GC-MS QP 2010 Ultra EI (“Shimadzu”, Япония), снабженном автоматическим устройством ввода пробы и квадрупольным масс-спектрометрическим детектором. Сбор данных и обработку хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения LabSolutions GCMSsolution (“Shimadzu”, Япония). Использовали колонку MDN-5 30 м × 250 мкм × 0.25 мкм (“Supelco”, США), в качестве подвижной фазы – гелий, скорость потока элюента – 1 см³/мин, деление потока 1 : 5. Объем вводимой пробы 1 мкл, температура термостата 120 °С, температура инжектора 200 °С. Температурный градиент: 120 °С выдержка 1 мин; с 120 до 280 °С со скоростью 10 °С/мин, изотерма 3 мин.

Двумерный электрофорез. Изоэлектрофокусирование белков проводили в градиенте pH от 3 до 10 с использованием системы для 2D электрофореза PROTEAN II XI 2-D Cell (Bio-Rad, США). Электрофорез образцов, полученных изоэлектрофокусированием, проводили в градиентном акриламидном геле (7,5–25 %) в присутствии додецилсульфата натрия при 300 В. Гели окрашивали раствором AgNO₃ (Sigma, США). Для получения белковых карт использовали систему геле-документации Infinity1000/26MX (Vilber Lourmat, Франция). Белковые карты анализировали с помощью программы ImageMaster 2D Platinum v. 7 (GE Healthcare, США).

Масс-спектрометрический анализ белков протеома и секретома. Полученные белковые пятна дополнительно анализировали с использованием масс-спектрометра Ultraflex II (Bruker, Германия) с матричным лазерным источником десорбции / ионизации и tandemным времяпролетным масс-анализатором (MALDI TOF/TOF MS/MS). Масс-спектры обрабатывали с помощью пакета программ FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Германия). Идентификацию белков проводили с помощью программы Mascot (www.matrixscience.com).

Результаты

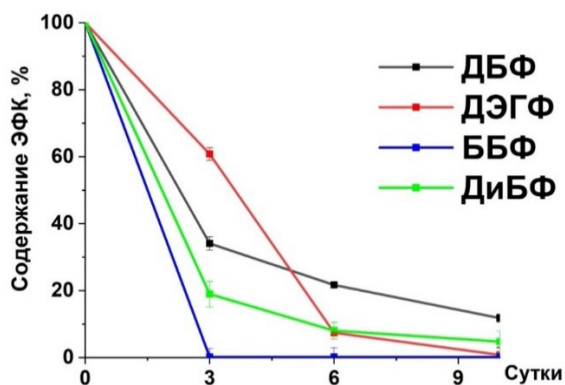


Рис. 1 Динамика биодеструкции различных эфиров фталевой кислоты культурой гриба *Trametes hirsuta* в течении 10-ти дневного культивирования на минимальной минеральной среде (ДБФ-дибутилфталат, ДЭГФ-ди (2-этилгексил) фталат, ББФ-бутилбензилфталат, ДиБФ-диизобутилфталат)

Динамика биодеструкции ЭФК. Показано, что гриб *T. hirsuta* способен эффективно разрушать все изучаемые соединения и уже к 10 суткам культивирования содержание всех ЭФК варьирует от 0,15 % до 11,8 % от их исходной концентрации в КЖ (Рис. 1). Скорость деструкции различных соединений фталатов снижается в ряду ББФ > ДиБФ ≈ ДЭГФ > ДБФ, и в общем случае коррелирует с длиной алкильной цепи и ее разветвленностью. При этом в процессе деструкции ЭФК показано достоверное повышение общей оксидазной и эстеразной активностей в КЖ гриба с фталатами по сравнению с контрольной минеральной средой. Причем высокая (по сравнению с контролем) эстеразная активность отмечена на 1–3 сутки культивирования, в то время как максимум оксидазной – на 6 сутки.

Анализ накопления грибной биомассы показал, что при глубинном культивировании в присутствии ЭФК, происходит снижение

биомассы *T. hirsuta* по сравнению с контрольной средой без фталатов, при этом наибольшее ингибирование роста гриба было отмечено на среде с ББФ.

Эксперименты по изучению способности грибного мицелия сорбировать гидрофобные соединения ЭФК из культуральной среды, показали, что на 10 день инкубации инактивированных пеллет биосорбция ЭФК составляет от 80 до 90 % от их начального содержания в среде.

Определение состава секретомов и протеомов *Trametes hirsuta* при культивировании с различными фталатами. Для определения и идентификации внеклеточных ферментов, участвующих в деструкции фталатов, было проведено исследование белков секретомы (экзопротеомы) гриба *T. hirsuta* при его культивировании с изучаемыми соединениями ЭФК. Список идентифицированных белков представлен на рисунке 2.

Белок	Описание	Аббревиатура	ММ (контроль)	ММ+ББФ	ММ+ДиБФ	ММ+ДБФ	ММ+ДЭГФ
Оксидоредуктазы							
FUN_007004	Manganese peroxidase 2	MnP2	●	●	●	●	●
FUN_002850	Manganese peroxidase 5	MnP5	●	●	●	●	●
FUN_007983	Manganese peroxidase 7	MnP7	●	●	●	●	●
FUN_007604	Versatil peroxidase 2	VP2	●	●	●	●	●
FUN_007002	Lignin peroxidase 9	LiP9	●	●	●	●	●
FUN_007454	Manganese peroxidase 3	MnP3	●	●	●	●	●
FUN_007952	Manganese peroxidase 6	MnP6	●	●	●	●	●
FUN_007001	Lignin peroxidase 2	LiP2	●	●	●	●	●
FUN_001030	Laccase A	LacA	●	●	●	●	●
Протеазы							
FUN_006633	Protease S53	ProtS53_1	●	●	●	●	●
FUN_009440	Protease S53	ProtS53_2	●	●	●	●	●
CAZy гидролазы							
FUN_009362	Glycoside Hydrolase Family 15 with CBM20	GH15+CBM20	●	●	●	●	●
Другие							
FUN_002699	Amidase	Am	●	●	●	●	●
FUN_005650	Alpha/beta hydrolase family protein (PF00135)	α/β HFP	●	●	●	●	●
FUN_001506	The cell wall integrity and stress response	WSC	●	●	●	●	●
FUN_009768	Hypothetical protein	HP1	●	●	●	●	●

Рис. 2 Белки, идентифицированные в секретомы *Trametes hirsuta* при выращивании на средах с различными фталатами

Сравнительный анализ секретомы *T. hirsuta* показал, что основными белками, секретируемыми на средах со всеми фталатами, являются белки лигнолитического комплекса гриба, такие как лигнин пероксидазы (LiP), марганец пероксидазы (MnP), версатил пероксидаза (VP) и лакказы (LacA). При этом в зависимости от добавляемого фталата меняется как изоферментный состав лигнолитических ферментов, так и их относительные количества. Так изофермент лигнин пероксидазы LiP9 обнаруживается как на контрольной среде без добавления фталатов, так и в средах со всеми изучаемыми фталатами, однако, ее количество возрастает в средах с добавлением ДиБФ и ДЭГФ. Изофермент марганец пероксидазы MnP7 также обнаруживается как на контрольной среде без добавления фталатов, так и на средах со всеми изучаемыми фталатами, но заметное увеличение количества данного белка наблюдается только на среде с ББФ. Изофермент марганец пероксидазы MnP5 обнаруживается на всех средах за исключением среды с добавлением ДЭГФ, при этом содержание данного белка значительно возрастает на среде с добавлением ДиБФ. Изофермент марганец пероксидазы MnP2 обнаруживается в незначительном количестве только на среде с ББФ. Версатил пероксидаза VP2 обнаруживается на всех средах (за исключением среды с добавлением ББФ), при этом ее количество значительно возрастает в средах с добавлением ДиБФ и ДЭГФ. Изофермент лакказы LacA также обнаруживаются в значительных количествах (по сравнению с контрольной средой) на всех средах за исключением среды с добавлением ДЭГФ.

Считается, что внеклеточные ферменты грибов играют преобладающую роль в деструкции ксенобиотиков, однако все большее количество исследований показывает, что внутриклеточная ферментативная система также является важным внутренним механизмом детоксикации и приспособляемости грибов к агрессивным условиям окружающей среды.

Для идентификации внутриклеточных ферментов гриба *T. hirsuta*, принимающих участие в метаболизме соединений ЭФК и продуктов их трансформации был проведен сравнительный анализ грибных протеомов. В протеомах в присутствии фталатов отмечено появление значительного количества таких белков как: ацетил эстераза / липаза Aes (COG0657); каталаза KatE (COG0753; КФ: 1.11.1.6); NADH: флавин оксидоредуктаза OYE32 (COG1902; КФ: 1.3.1.42); белки из семейства короткоцепочечных алкогольдегидрогеназ SDR (COG1028); альдокеторедуктазы AKR (COG0656); арилалкогольдегидрогеназы (COG0667); альдегиддегидрогеназы AdhE (COG1012; КФ: 1.2.1.3) и др.

В присутствии ББФ в протеоме были обнаружены также уникальные белки, такие как, например, хинол монооксигеназа YgiN (COG1359). Предположительно, индукция данного фермента может быть адаптивной клеточной реакцией, направленной на минимизацию токсичности различных хиноновых соединений.

Таким образом, на основании идентифицированных в секретах и протеомах белках, можно заключить, что ферментативная деградация ЭФК базидиальным грибом *T. hirsuta* осуществляются в две фазы. Первая фаза включает процесс гидролиза сложного эфира фталевой кислоты при участии эстераз, в результате чего образуются фталевая кислота и соответствующие спирты. Затем фталевая кислота и метаболиты, образующиеся при разложении фталевой кислоты и спиртов, расщепляются декарбоксилазами / дегидрогеназами / оксидазами / оксигеназами во время второй фазы реакции.

Заключение

Дереворазрушающий гриб белой гнили *Trametes hirsuta* способен эффективно разрушать различные эфиры фталевой кислоты и может быть использован для устранения загрязнений этих опасных ксенобиотиков из окружающей среды. При этом биodeградационная стратегия данного гриба включает взаимодополняемый комплекс неферментативных процессов, таких как биосорбция, и процессов, опосредованных комбинированным действием внеклеточных и внутриклеточных ферментных систем (Рис. 3).

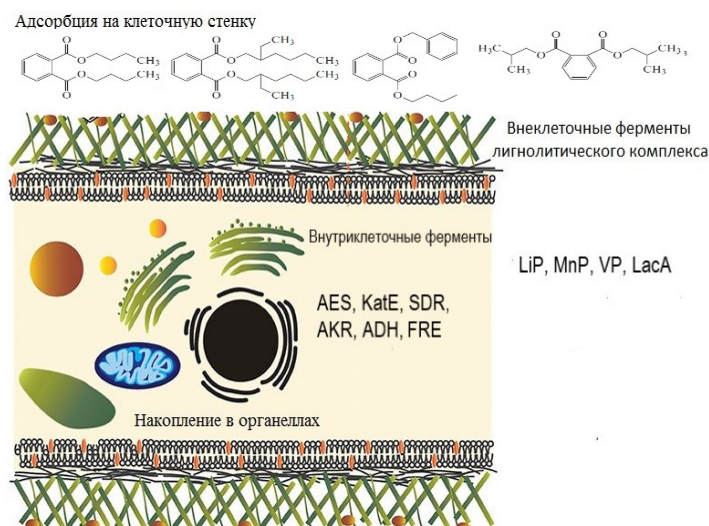


Рис. 3 Биodeградационная стратегия гриба *Trametes hirsuta* по отношению к различным ЭФК (AES – ацетил эстераза / липаза; KatE – каталаза; FRE – NADH: флаavin оксидоредуктаза; SDR – белки из семейства короткоцепочечных алкогольдегидрогеназ; AKR – альдокеторедуктазы; ADH – арилалкогольдегидрогеназы; LiP – лигнин пероксидаза; MnP – марганец пероксидаза; VP – версатил пероксидаза; LacA – лакказа А)

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

Литература

1. Tran H.T. et al. Phthalates in the environment: characteristics, fate and transport, and advanced wastewater treatment technologies // *Bioresource Technology*. – 2022. – V. 344. – P. 126249.
2. Net S. et al. Occurrence, fate, behavior and ecotoxicological state of phthalates in different environmental matrices // *Environmental Science & Technology*. – 2015. – T. 49. – №. 7. – P. 4019–4035.
3. Giuliani A. et al. Critical review on the presence of phthalates in food and evidence of their biological impact // *International journal of environmental research and public health*. – 2020. – V. 17. – N. 16. – P. 5655.
4. Wang Y., Qian H. Phthalates and their impacts on human health // *Healthcare*. – MDPI, 2021. – V. 9. – N. 5. – P. 603.
5. Kathiravan A., Gnanadoss J.J. White-rot fungi-mediated bioremediation as a sustainable method for xenobiotic degradation // *Environmental and Experimental Biology*. – 2021. – V. 19. – N. 3. – P. 103–119.
6. Chatterjee A., Chakraborty P., Abraham J. Microbial Enzymes for the Mineralization of Xenobiotic Compounds // *Bioprospecting of Microorganism Based Industrial Molecules*. – 2021. – P. 319–336.