
Kultivavimo sąlygų įtaka mikromicetų fenoloksidaziniam aktyvumui

**Regina Varnaitė,
Vita Raudonienė**

*Biodestruktorių tyrimo laboratorija,
Botanikos institutas,
Žaliųjų ežerų g. 49,
LT-2021 Vilnius, Lietuva*

Ištirta perspektyviausių mikromicetų lignino-celiuliozės komplekso ardytojų fenoloksidazių – peroksidazės, lakazės ir tirozinazės – aktyvumas skystafazės ir tvirtafazės fermentacijos sąlygomis.

Nustatyta, kad kultivuojant mikromicetus *Galactomyces geotrichum*, *Myrothecium verrucaria* ir *Papularia sphaerosperma* skystafazės fermentacijos sąlygomis su lengviau pasisavinamu anglies šaltiniu jų peroksidazinio fermentinio aktyvumo nebuvo.

Kultivuojant šiuos mikromicetus ant rugių šiaudų (tvirtafazė fermentacija), 4-ą kultivavimo parą peroksidazinis aktyvumas buvo lygus atitinkamai 31,1; 52,7 ir 5,2 a. v./g. Lignino kiekis esant tokiam peroksidazės aktyvumui sumažėjo atitinkamai 1,25; 1,15 ir 1,14 karto, palyginus su kontrole. Toliemesnio kultivavimo eigoje mikromicetų peroksidazinis aktyvumas mažėjo ir po 20 kultivavimo parų jis buvo atitinkamai 3,93; 5,36 a. v./g., o *Papularia sphaerosperma* aktyvumas visai nepasireiškė.

Didžiausias tirozinazinis aktyvumas (6,45 sąl. v./ml) nustatytas *Galactomyces geotrichum*, kultivuojant jį standartinėje Čapeko terpėje 13 parų. Toliemesnio kultivavimo eigoje šio mikromiceto tirozinazinis aktyvumas mažėjo ir 21-ą kultivavimo parą buvo 3,93 sąl. v./ml. Šio mikromiceto tirozinazinis aktyvumas tvirtafazės fermentacijos sąlygomis buvo nedidelis ir per 21 parą kito nuo 0,0046 iki 0,124 sąl. v/g. Mikromiceto *Myrothecium verrucaria* tirozinazinis aktyvumas skystafazės fermentacijos sąlygomis buvo mažesnis, palyginus su *Galactomyces geotrichum* tirozinaziniu aktyvumu, o tvirtafazės fermentacijos sąlygomis – didesnis, didžiausias aktyvumas (0,869 sąl. v./g) nustatytas 8-ą kultivavimo parą.

Mikromicetų lakazinis aktyvumas tiek tvirtafazės, tiek skystafazės fermentacijos sąlygomis buvo labai nedidelis. Ekstinkcijos koeficientas (ekst. k.) kito nuo 0,003 iki 0,059 (skystafazė fermentacija) ir nuo 0,01 iki 0,075 (tvirtafazė fermentacija).

Raktažodžiai: mikromicetai, fenoloksidazės: peroksidazė, tirozinazė, lakazė, ligninas

IVADAS

Mikroorganizmų mitybos šaltinis – įvairūs substratai, tarp jų ir augalinės atliekos, kurių pagrindinę masę sudaro celiuliozė, hemiceliuliozė ir ligninas. Gamtoje augalinių atliekų destrukcija – tai daugiapakopis polienziminis procesas, kuriame dalyvauja daug fermentinių sistemų. Pagrindiniai mikromicetų gaminami fermentai, dalyvaujantys lignino degradacijos procese, yra fenoloksidazės: lignino peroksidazė, Mn-peroksidazė ir lakazė [1, 4, 5].

Fenoloksidazės katalizuoja vieno elektrono atėmimą iš lignino fenolinių hidroksilinių grupių. Taip susidaro fenoksilo radikalai, galintys dalyvauti įvairiose reakcijose. Fenoloksidazių aktyvumui ir augalinių

atliekų irimo eigai didelę įtaką turi įvairūs ekologiniai veiksniai, sąlygos, kuriomis mikromicetas auga ir vystosi. Pastaruoju metu daug dėmesio skiriama mikromicetų fermentiniam aktyvumui, vykdant augalinių atliekų biodegradaciją tvirtafazės fermentacijos sąlygomis [2, 3, 7, 8].

Darbo tikslas buvo ištirti mikromicetų – perspektyviausių lignino-celiuliozės komplekso ardytojų augalų atliekose fenoloksidazių aktyvumą. Tai vienas pagrindinių kriterijų, nusakančių mikroorganizmų gebėjimą skaidyti sunkiai ardomus lignino-celiuliozės kompleksus. Natūraliomis sąlygomis augalų atliekos ardomos lėtai. Šiais tyrimais siekta išaiškinti optimalias sąlygas, kurioms esant būna didesnis fermentinis fenoloksidazinis aktyvumas, kartu turėtų sparčiau

degraduoti ir lignino-celiuliozės kompleksas augalų atliekose.

METODIKA

Bandymuose panaudojome mikromicetus – perspektyviausius lignino-celiuliozės komplekso ardytojus augalų atliekose. Buvo išskirti, apibūdinti ir tiriami šie mikromicetai: *Galactomyces geotrichum* (Butl. et Petersen) Redhead et Malloch, *Myrothecium verrucaria* (Alb. et Schweinitz) Ditmar ex Fries. ir *Papularia sphaerosperma* (Pers) Höhn.

Mikromicetai buvo kultivuojami standartinėje Čapeko terpėje (skystafazės fermentacijos sąlygomis) ir ant rugių šiaudų (tvirtafazės fermentacijos sąlygomis), labiausiai priartinus prie natūralių sąlygų, 21 parą 28°C temperatūroje (optimaliomis sąlygomis). Pavyzdžiai fermentų peroksidazės, lakazės ir tirozinazės aktyvumui nustatyti buvo imami po 4, 8, 13, 18, 21 paros.

Peroksidazės aktyvumas buvo nustatinėjamas su o-dianizidino reaktivu [9], lakazės – p-fenilendiami-nochloridu [6], tirozinazės – pirokatechinu [9].

Lignino kiekis augalų atliekose buvo nustatinėjamas Chudiakovos metodu [10].

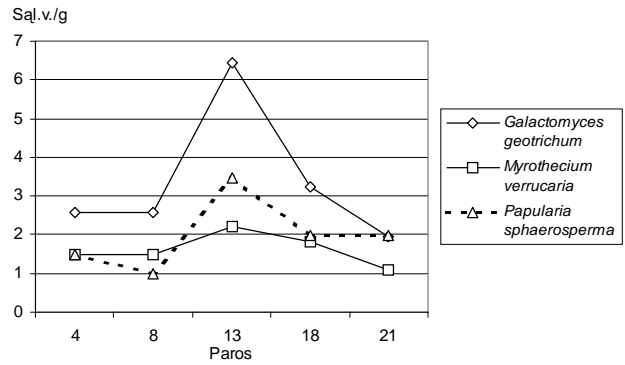
REZULTATAI IR DISKUSIJA

Fermentų aktyvumas skystafazės fermentacijos sąlygomis. Tyrimai parodė, kad per visą mikromicetų kultivavimo standartinėje Čapeko terpėje laiką (21 parą) peroksidazinis mikromicetų aktyvumas nepasireiškė, išskyrus *Galactomyces geotrichum*, kurio aktyvumas po 13 kultivavimo parų buvo 0,56 a. v./ml. Tolimesnio kultivavimo eigoje nefiksuota šio mikromiceto peroksidazinio aktyvumo. Matyt tai yra lengviau pasisavinamas anglies šaltinis (gliukozė), kurį oksidina kiti fermentai (gliukozoksidazė).

Tirozinazinis aktyvumas. Tyrimai parodė, kad per visą kultivavimo laiką didžiausiu tirozinaziniu aktyvumu išsiskyrė *Galactomyces geotrichum*. Didžiausias fermento aktyvumas (6,45 sąl. v./ml) buvo nustatytas kultivuojant jį standartinėje Čapeko terpėje 13 parų. Tolimesnio kultivavimo eigoje *Galactomyces geotrichum* tirozinazinis aktyvumas palaipsniui mažėjo: po 18 ir 21 paros – atitinkamai 3,23 ir 1,94 sąl. v./ml (1 pav.).

Didžiausias (2,2 sąl. v./ml) *Myrothecium verrucaria* tirozinazinis aktyvumas irgi buvo nustatytas po 13 jo kultivavimo parų; 21-ą kultivavimo parą šio mikromiceto aktyvumas sumažėjo iki 1,1 sąl. v./ml.

Papularia sphaerosperma tirozinazinis aktyvumas kultivavimo pradžioje buvo permainingas: po 4 kultivavimo parų – 1,48, po 8 – iki 0,99 sąl. v./ml. Kaip ir kitų minėtųjų mikromicetų, didžiausias fermento aktyvumas (3,46 sąl. v./ml) buvo po 13 kultivavimo



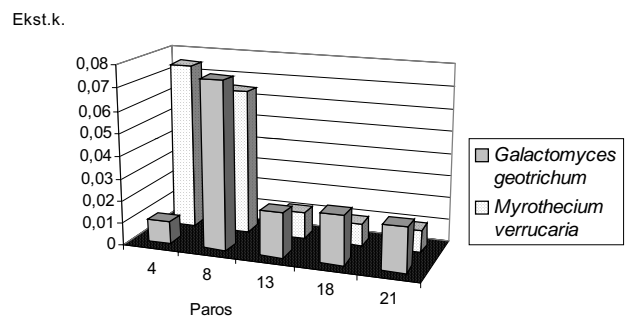
1 pav. Mikromicetų tirozinazinis aktyvumas, kultivuojant juos skystafazės fermentacijos sąlygomis

Fig. 1. Tyrosinase activity of micromycetes under liquid-state fermentation conditions

parų. Tolimesnio kultivavimo eigoje, po 18 parų, tirozinazinis aktyvumas sumažėjo (iki 1,98 sąl. v./ml) ir išliko nepakitęs 21-ą kultivavimo parą.

Tirozinazinio aktyvumo kitimas mikromicetų kultivavimo eigoje, didžiausias aktyvumas 13-ą kultivavimo parą, po to mažėjantis aktyvumas rodo, kad baigiasi mikromiceto augimas, prasideda jo senėjimo procesai. Šiame periode mikromicetai ima sintetinti kitus metabolitus ir fermentinis aktyvumas palaipsniui mažėja.

Lakazinis aktyvumas. Tyrimai parodė (2 pav.), kad tirtųjų mikromicetų lakazinis aktyvumas buvo nedidelis. Šiek tiek didesnis fermentinis aktyvumas nustatytas mikromicetų kultivavimo pradžioje. Po 4 kultivavimo parų *Myrothecium verrucaria* ekst. koeficientas buvo lygus 0,059, *Galactomyces geotrichum* – 0,051, *Papularia sphaerosperma* – 0,05. Toliau kultivuojant tirtųjų mikromicetų lakazinis aktyvumas buvo permainingas: po 8 kultivavimo parų sumažėjo, po 13 parų šiek tiek padidėjo, toliau kultivuojant vėl sumažėjo. *Galactomyces geotrichum* lakazinio aktyvumo ekst. koeficientas po 18 ir 21 kultivavimo paros buvo lygus 0,23, *Myrothecium verrucaria* – nežymiai padidėjo (nuo 0,025 iki 0,03), *Papularia sphaerosperma* – sumažėjo (nuo 0,03 iki 0,026).



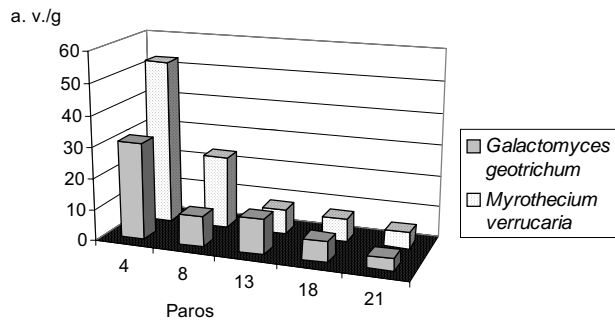
2 pav. Mikromicetų lakazinis aktyvumas, kultivuojant juos skystafazės fermentacijos sąlygomis

Fig. 2. Laccase activity of micromycetes under liquid-state fermentation conditions

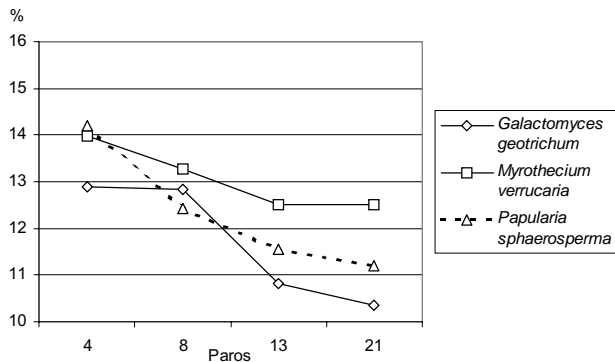
Fermentų aktyvumas tvirtafazės fermentacijos sąlygomis. Tyrimai parodė (3 pav.), kad tirtųjų mikromicetų, kultivuojamų tvirtafazės fermentacijos sąlygomis, buvo peroksidazinis aktyvumas. Tai aiškina ma tuo, kad mikromicetai, augdami ant substratų, kuriuose yra sunkiai pasisavinami anglies šaltiniai, išvysto peroksidazinį aktyvumą, kuriuo ir pradeda ardyti ligniną.

Po 4 kultivavimo parų *Galactomyces geotrichum* peroksidazinis aktyvumas buvo 31,1, *Myrothecium verrucaria* – 52,7 a. v./g. Mažiausias peroksidazinis aktyvumas (5,2 a. v./g) nustatytas po *Papularia sphaerosperma* kultivavimo. Lignino degradacijos laipsnis esant tokiam peroksidazės aktyvumui buvo atitinkamai 12,88; 13,98 ir 14,19%, kontrolė – 16,2% (4 pav.).

Tolimesnio kultivavimo eigoje (po 8 parų) mikromicetų peroksidazinis aktyvumas mažėjo: *Galactomyces geotrichum* – 9,93, *Myrothecium verrucaria* – 26,32, *Papularia sphaerosperma* – iki 1,81 a. v./g. Lignino degradacijos laipsnis šiame periode mažai tepakito, jis labiau pakito po mikromiceto *Papularia sphaerosperma* kultivavimo – 1,3 karto, palyginus su kontrole.



3 pav. Mikromicetų peroksidazinis aktyvumas, kultivuojant juos tvirtafazės fermentacijos sąlygomis
Fig. 3. Peroxidase activity of micromycetes under solid-state fermentation conditions



4 pav. Lignino kiekio augalų atliekose pokytis pradinėse mikromicetų kultivavimo stadijose
Fig. 4. Change of lignin content in plant remnants during initial cultivation of micromycetes

Po 13 kultivavimo parų *Galactomyces geotrichum* peroksidazinis aktyvumas padidėjo iki 11,2, *Myrothecium verrucaria* sumažėjo iki 8,012 a. v./g, *Papularia sphaerosperma* aktyvumas nepasireiškė. Lignino kiekis šiame periode po *Galactomyces geotrichum* kultivavimo sumažėjo 1,49, *Myrothecium verrucaria* – 1,29 ir *Papularia sphaerosperma* – 1,4 karto, palyginus su kontrole.

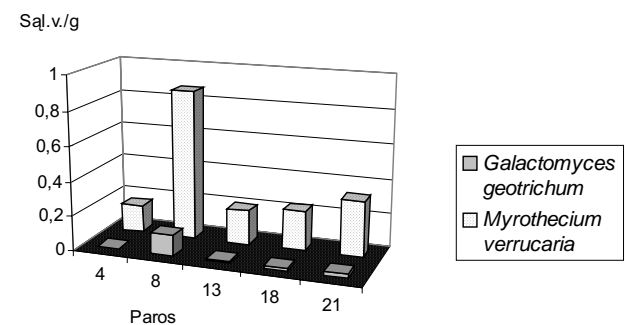
Tolimesnio kultivavimo eigoje mikromicetų peroksidazinis aktyvumas mažėjo: 21-ą kultivavimo parą *Galactomyces geotrichum* – 3,93, *Myrothecium verrucaria* – 5,36 a. v./g. *Papularia sphaerosperma* peroksidazinis aktyvumas po 18 ir 21 kultivavimo paros nepasireiškė. Lignino degradacijos laipsnis šiame periode buvo mažesnis atitinkamai 1,56, 1,29 ir 1,44 karto, palyginus su kontrole.

Yra nustatyti 2 peroksidazinio aktyvumo maksimumai. Ankstesnių tyrimų duomenimis, antras šių mikromicetų peroksidazės aktyvumo maksimumas buvo po 30 ir 60 jų kultivavimo parų. Tai aiškina ma tuo, kad kultivuojant mikromicetus ant sudėtingų gamtinių polimerų vyksta netolygus micelio priaugimas ir atmirimas, pasireiškiantis netolygiu fermentiniu aktyvumu. Tai patvirtina ir kitų autorių [8] atliktų tyrimų, kultivuojant *Tyromyces lacteus* ant rugių šiaudų (tvirtafazė fermentacija), duomenys.

Tirozinazinis aktyvumas. Tirozinazinis mikromicetų aktyvumas tvirtafazės fermentacijos sąlygomis buvo gerokai mažesnis, palyginus su jo aktyvumu skystafazės fermentacijos sąlygomis.

Po 4 kultivavimo parų *Galactomyces geotrichum* tirozinazinis aktyvumas buvo 0,0046, po 8 parų jis padidėjo iki 0,124 sąl. v./g. Tolimesnio kultivavimo eigoje šio mikromiceto tirozinazinis aktyvumas buvo permainingas ir išliko labai nedidelis: 21-ą kultivavimo parą – 0,0249 sąl. v./g (5 pav.).

Mikromiceto *Myrothecium verrucaria* tirozinazinis aktyvumas po 4 kultivavimo parų buvo 0,160; po 8 parų padidėjo iki 0,869; po 13 parų sumažėjo iki 0,1998 ir po 20 parų vėl padidėjo iki 0,324 sąl. v./g.



5 pav. Mikromicetų tirozinazinis aktyvumas, kultivuojant juos tvirtafazės fermentacijos sąlygomis
Fig. 5. Tyrosinase activity of micromycetes under solid-state fermentation conditions

Mikromiceto *Papularia sphaerosperma* tirozinazinis aktyvumas buvo mažiausias, palyginus su kitų kultivuotų mikromicetų aktyvumu, ir po 4 kultivavimo parų buvo 0,0055 sąl. v./g. Tolimesnio kultivavimo eigoje šio mikromiceto aktyvumas nepasireiškė ir tik 21-ą kultivavimo parą buvo lygus 0,218 sąl. v./g. Tirozinazės ir kitų fermentų aktyvumui didelę įtaką turi destrukcijos metabolitai, kurie susidaro irstant augalų atliekoms. Tam tikrais periodais, šiems metabolitams patekus į aplinką, vieni jų skatina fermentinį aktyvumą, kiti slopina. Todėl kultivavimo eigoje fermentinis aktyvumas kinta.

Lakazinis mikromicetų aktyvumas, ir skysta-, ir tvirtafazės fermentacijos sąlygomis, buvo labai nedidelis (6 pav.) Šiek tiek didesnis *Galactomyces geotrichum* (ekst. k. 0,075) ir *Myrothecium verrucaria* (0,065) fermentinis aktyvumas buvo nustatytas po 8 mikromicetų kultivavimo parų.

Didžiausias *Papularia sphaerosperma* lakazinis aktyvumas (ekst. k. 0,08) nustatytas po 13 kultivavimo parų.

Daroma išvada, kad kultivavimo sąlygos labiausiai veikia mikromicetų peroksidazinį aktyvumą. Skystafazės fermentacijos sąlygomis, esant lengviau pasisavinamam anglies šaltiniui, šis aktyvumas beveik nepasireiškė, o tvirtafazės fermentacijos sąlygomis, kai anglies šaltinis yra ligninas, mikromicetų *Galactomyces geotrichum* ir *Myrothecium verrucaria* fermentinis aktyvumas kultivavimo pradžioje (po 4 parų) buvo atitinkamai 31,1 ir 52,7 a. v./g. Antras mikromiceto *Galactomyces geotrichum* peroksidazinio aktyvumo maksimumas (84,63 a. v./g) nustatytas po 60, *Myrothecium verrucaria* (84,63 a. v./g) – po 30 jų kultivavimo parų. Po šių mikromicetų kultivavimo lignino degradacijos laipsnis buvo atitinkamai 1,92 ir 1,65 karto didesnis, palyginus su kontrole.

Bendrųjų tirozinazinio aktyvumo dėsningumų, kultivuojant mikromicetus skysta- ir tvirtafazės fermentacijos sąlygomis, išaiškinti nepavyko. Didesnis mikromiceto *Galactomyces geotrichum* tirozinazinis akty-

vumas (6,45 sąl. v./ml) nustatytas skystafazės fermentacijos sąlygomis, *Myrothecium verrucaria* (0,869 sąl. v./g) – tvirtafazės fermentacijos sąlygomis.

Kultivavimo sąlygų įtakos mikromicetų lakaziniui aktyvumui nenustatyta.

Gauta
2002 06 10

Literatūra

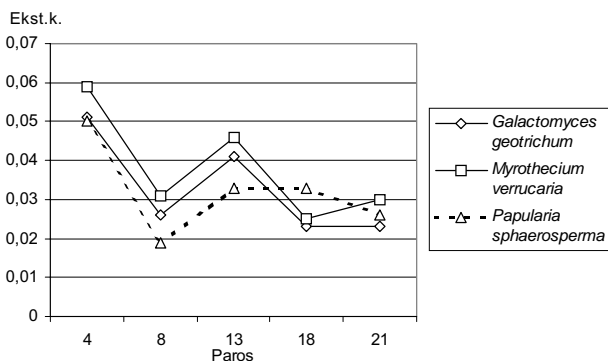
- Bonnarme P., Jeffries T. W. Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese dependent peroxidases from lignin-degrading white-rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990. N 36. P. 210–217.
- Del Pilar Cstillo M., Ander P., Stenstrom J. Lignin and manganese peroxidase activity in extracts from straw solid substrate fermentations. *Biotechnol. Technol.* 1997. Vol. 11. N 9. P. 701–706.
- Hernandez-Coronado M. I., Hernandez M., Centenera F., Perez-Leblic M. I., Ball A. S., Arias M. E. Chemical characterization and spectroscopic analysis of the solubilization products from wheat straw produced by streptomyces strains grown in solid-state fermentation. *Microbiology*. 1997. Vol. 143. N 64. P. 1359–1367.
- Kulys J. High potential oxidases kinetic and thermodynamic consideration accompanying degradation of lignin and recalcitrant organics. In: *Selection of fungi for degradation processes. Materials of International Conference*. Vilnius, 1997. P. 20–21.
- Perez J., Jeffries T. W. Mineralization of ¹⁴C-ring-labeled synthetic lignin correlates with the production of lignin peroxidase not Mn-peroxidase or laccase. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990. N 56. P. 1806–1812.
- Ravin H., Harward M. Rapid test for hepatolenticular degeneration. *The lancet*. 1965. Vol. 270. N 6920. P. 726–727.
- Reid Ion D., Paice Michael G. Effects of manganese peroxidase on residual lignin of softwood kraft pulp. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998. Vol. 64. N 6. P. 2273–2274.
- Бабицкая В. Г. Ферментативная деградация лигнина, содержащегося в растительных субстратах мицелиальными грибами. *Прикладная биохимия и микробиология*. 1994. Т. 30. Вып. 6. С. 827–835.
- Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П., Перуанский Ю. А. и др. *Методы биохимического исследования растений*. Ленинград, 1987.
- Худякова Х. К. Определение содержания лигнина в кормах и кормовых растениях. *Сельскохозяйственная биология*. 1984. № 8. С. 120–124.

Regina Varnaitė, Vita Raudonienė

INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS ON FUNGAL PHENOLOXIDASE ACTIVITY

S u m m a r y

The phenoloxidases: peroxidase, laccase and tyrosinase activities of the most perspective fungi – lignin-cellulose



6 pav. Mikromicetų lakazinis aktyvumas, kultivuojant juos tvirtafazės fermentacijos sąlygomis

Fig. 6. Laccase activity of micromycetes under solid-state fermentation conditions

complex destructors, were investigated under liquid-state and solid-state fermentation conditions.

It was found that *Galactomyces geotrichum*, *Myrothecium verrucaria* and *Papularia sphaerosperma* showed no peroxidase activity under liquid-state fermentation conditions.

When these fungi were cultivated on rye straw (solid-state fermentation), the peroxidase activity on the 4th cultivation day was correspondingly 31.1; 52.7 and 5.2 u/g. In the presence of such peroxidase activity, lignin content in plant remnants decreased 1.25; 1.15 and 1.14 times respectively in comparison with the control. In the further course of cultivation the fungal peroxidase activity decreased and after 21 days of cultivation it was correspondingly 3.93; 5.36 and 0.00 u/g.

Galactomyces geotrichum showed the highest tyrosinase activity (6.45 cu/ml) after 13 days of cultivation in the standard Czapek medium. In the course of the further cultivation the tyrosinase activity of this fungus decreased

and was 1.94 cu/ml on the 21st cultivation day. The tyrosinase activity of this fungus wasn't high under solid-state conditions and fluctuated from 0.0046 to 0.124 cu/g during 21 days. The tyrosinase activity of *Myrothecium verrucaria* was lower in comparison with *Galactomyces geotrichum* under liquid-state fermentation conditions and higher under solid-state fermentation conditions, reaching the maximum activity (0.869 cu/g) on the 8th day of cultivation.

Changes of phenoloxidase activity of micromycetes under solid-state fermentation conditions are probably related to the occurrence of lignin degradation products in the medium, which cause induction of these enzymes.

The laccase activity of the fungi was low both under solid-state and liquid-state conditions. The extinction coefficient fluctuated from 0.002 to 0.059 during liquid-state and from 0.01 to 0.075 during solid-state fermentation.

Key words: micromycetes, phenoloxidases: peroxidases, tyrosinases, laccases, lignin