

ИНДУКТОРЫ АКТИВНОСТИ Mn-ПЕРОКСИДАЗЫ И ЛАККАЗЫ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SP245

© 2013 М.А. Купряшина, Е.П. Ветчинкина, Е.Г. Пономарева, В.Е. Никитина

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

Поступила 11.01.2013

Подобраны индукторы лакказной и Mn-пероксидазной активности эндофитного штамма *Azospirillum brasilense* Sp245. Показано, что фенолоксидазы из культуральной жидкости проявляют более высокую активность, по сравнению с внутриклеточными. Кроме того, Mn-пероксидазная активность превышает лакказную по меньшей мере в пять раз. Окислительная способность ферментов индуцируется присутствием ароматических соединений в среде выращивания.

**Ключевые слова:** бактерии *Azospirillum brasilense*, фенолоксидазная активность, лакказа, Mn-пероксидаза, индукторы.

Лакказа и Mn-пероксидаза – неспецифические оксидоредуктазы, широко распространенные в природе, участвующие в процессе деполимеризации лигнина; катализирующие окислительное расщепление многих ароматических, гетероциклических, хлорорганических веществ. Каталитическое действие оксидоредуктаз можно разделить на две стадии: 1) ферментативное окисление субстрата с образованием реакционно-способных промежуточных продуктов – феноксильных радикалов и хинонов при окислении фенольных групп, арильных радикалов при окислении нефенольных субстратов или  $Mn^{3+}$  при окислении  $Mn^{2+}$ ; 2) пост-ферментативные спонтанные реакции, инициируемые свободными радикалами. Пост-ферментативная свободно-радикальная стадия существенно расширяет набор субстратов, подвергающихся окислительной атаке [1].

Неспецифические оксидоредуктазы, продуцируются, в основном, грибами, однако в последнее время появились экспериментальные данные о фенолоксидазах бактериального происхождения [2–4], в том числе о лакказной активности бактерий рода *Azospirillum* [5–8].

Бактерии рода *Azospirillum* относятся к свободно живущим азотфиксирующим почвенным микроорганизмам и обладают способностью колонизировать поверхности корней и стеблей высших растений, активно фиксируя молекулярный азот атмосферы и передавая связанные его формы растению-хозяину.

Выявленные нами ранее [8] лакказная и Mn-пероксидазная активности ряда штаммов бакте-

рий рода *Azospirillum* имели достаточно низкие значения. В связи с этим, целью нашей работы явился поиск индукторов, позволяющих увеличить активность Mn-пероксидазы и лакказы *Azospirillum brasilense* Sp245.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Бактерии и условия выращивания. В качестве объекта исследования нами был выбран типовой штамм *A. brasilense* Sp245 (коллекция микроорганизмов ИБФРМ РАН), эндофитный симбионт злаковых растений. Культивирование бактерий осуществляли при температуре 37°C на жидкой малатной среде следующего состава (г/л):  $KH_2PO_4$  – 0.1;  $K_2HPO_4$  – 0.4; NaCl – 0.1;  $Na_2MoO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.002;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.2;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.02; яблочная кислота – 5; NaOH – 1.7;  $NH_4Cl$  – 1;  $CaCl_2$  – 0.02; 1мМ  $MnSO_4 \cdot 5H_2O$  (pH=6.8). А также на агаризованной питательной среде содержащей (г/л):  $KH_2PO_4$  – 0.4;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.01;  $CaCl_2$  – 0.026;  $MgSO_4$  – 0.2;  $KNO_3$  – 0.05 и глюкозу – 1.44 (pH=6.8) [9].

Качественное обнаружение способности *A. brasilense* Sp245 окислять полифенольные субстраты. Способность растущей культуры окислять хромогенные субстраты определялась на чашках Петри через 24 часа культивирования бактерий. Для этого на поверхность растущих бактериальных колоний наносили 0.2 мМ раствор 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) (АБТС, «Sigma», США) в 50 мМ Na-тарtratном буфере (pH=4.5) [10], 0.2% 2,6-диметоксифенола (ДМОФ, «Acros», США) в 50 мМ Na-тарtratном буфере (pH=4.5) [11] и 0.02% синингалдазина («Acros», США) в 50 мМ Трис-HCl буфере (pH=7.5) [12]. Наличие реакции окисления определяли по появлению зеленого окрашивания бактерий и среды культивирования в первом случае, коричневого во втором и розового в третьем.

Определение активности фермента. Активность ферментов определяли спектрофотометрически на приборе Specord M 40 («Carl Zeiss», Герма-

Купряшина Мария Александровна, аспирант, м.н.с. лаборатории микробиологии, kupryashina\_m@mail.ru; Ветчинкина Елена Павловна, кандидат биологических наук, с.н.с. лаборатории микробиологии, elenavetrus@yandex.ru; Пономарева Елена Геннадьевна, кандидат биологических наук, с.н.с. лаборатории микробиологии, pomomareva@ibppm.sgu.ru; Никитина Валентина Евгеньевна, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией микробиологии, nikitina@ibppm.sgu.ru

ния). Активность лакказы определяли по скорости окисления 1 мМ ДМОФ в 50 мМ Na-тарtratном буфере (рН=4.5). Активность Mn-пероксидазы определяли по скорости окисления ДМОФ [13], реакцию начинали добавлением 1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Окисление ДМОФ до устойчивого катион-радикала измеряли по увеличению поглощения при длине волны 468 нм ( $\epsilon_{468}$  30500 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>). Реакционную смесь инкубировали 3 часа при температуре 30°C в жидкостном термостате. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль субстрата за минуту на 1 л.

Экстракция ферментов. Для отделения бактериальных клеток культуральную жидкость центрифугировали 15 мин при 20 °С и 12000 g. Внеклеточную ферментативную активность определяли в супернатанте.

С целью получения фракции ферментов, находящихся на поверхности бактериальной клетки, использовали модифицированный метод «стрижки» клеток [14]: клеточную суспензию несколько раз пропускали через шприц с размерами иглы 0,8x38, затем суспензию центрифугировали при 12000g 15 минут, супернатант отделяли от осадка и фильтровали.

Для получения внутриклеточных ферментов, полученные клетки разрушали ультразвуком в течение 5 минут, используя тот же буфер, центрифугировали при 12000g 15 минут, супернатант отделяли от осадка и фильтровали.

Внесение фенольных соединений в среду выращивания. Для исследования влияния фенольных соединений на ферментативную активность в среду выращивания при засеве культуры вносили сирингалдазин, ДМОФ и АБТС в концентрациях 0.1 мМ; 0.5 мМ и 1 мМ. Пробы для определения внеклеточной ферментативной активности отбирали через 24 и 36 часов после инокуляции, т.е. в экспоненциальную и стационарную фазу роста соответственно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью качественных методов нами была обнаружена способность *A. brasilense* Sp245 окислять ряд полифенольных соединений. Фенолоксидазная активность выявлялась визуально, после нанесения хромогенных субстратов, по мере накопления окрашенных продуктов окисления.

Нами отмечено, что *A. brasilense* Sp245 неодинаково интенсивно окислял используемые фенольные соединения. Наиболее активно, по сравнению с другими субстратами, данная бактерия разлагала ДМОФ. Мы наблюдали появление темно-коричневых продуктов окисления.

В контрольных чашках колонии бактерий *Azospirillum* имели бледно-кремовый цвет, а среда культивирования – желтоватый и прозрачный.

Также исследуемый штамм давал положительную реакцию с сирингалдазином, о чем мож-

но было судить по появлению бледно розового окрашивания на чашках с культурами бактерий. Однако окислять АБТС в данных условиях эксперимента *A. brasilense* Sp245 был не способен.

Исследование ферментативной активности показало, что Mn-пероксидазная и лакказная активности в культуральной жидкости и в смывах с поверхности клеток, а также внутриклеточная активность сильно варьируют. Данные по активности фенолоксидаз бактерии *A. brasilense* Sp245, выращенной на жидкой среде без внесения индукторов, представлены в таблице.

**Таблица.** Активность Mn-пероксидазы и лакказы *A. brasilense* Sp245

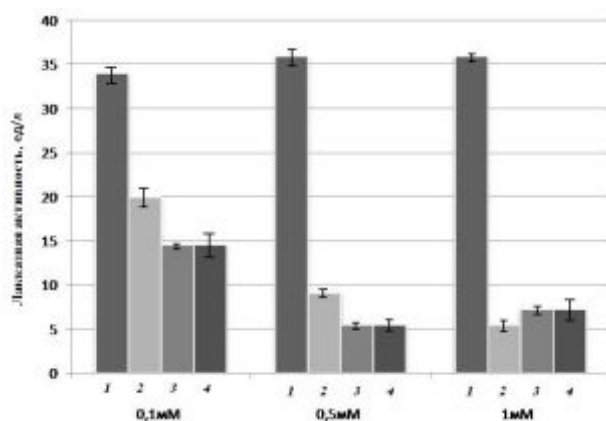
Источник получения ферментов	Активность, ед/л	
	Mn-пероксидаза	Лакказа
культуральная жидкость	45	9.1
смыв с поверхности клеток	6.6	13.1
внутриклеточный экстракт	3.0	4.9

Высокая активность Mn-пероксидазы обнаруживалась в культуральной жидкости (45 ед/л), однако внутриклеточная активность данного фермента имела низкие значения. Мы обнаружили, что для лакказы также характерны низкие значения внутриклеточной активности. В смывах с поверхности бактериальных клеток активность Mn-пероксидазы не превышала 6.6 ед/л, лакказная активность оказалась больше (13.1 ед/л). Интересно отметить, что именно в экстрактах полученных по модифицированному методу «стрижки» клеток лакказная активность была максимальной. Активность лакказы *A. brasilense* Sp245 в культуральной жидкости оказалась в 5 раз меньше Mn-пероксидазной. При этом внеклеточная активность ферментов возрастала на вторые сутки культивирования бактерий, активность Mn-пероксидазы увеличивалась до 70.4 ед/л, а лакказы до 35.3 ед/л.

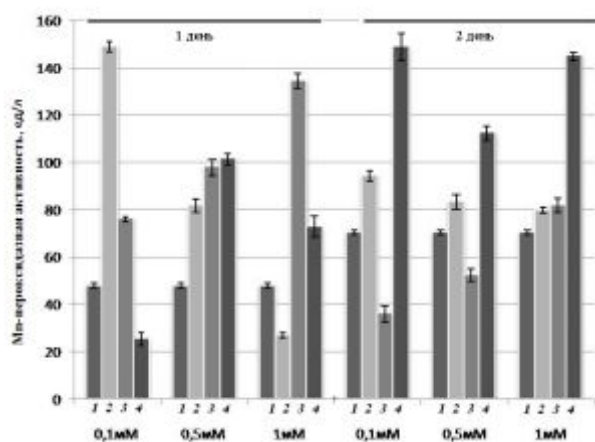
Для исследования влияния фенольных соединений на активность ферментов использовали культуральную жидкость. Активность лакказы в пробах, отобранных после 24 часов культивирования бактерии на жидкой питательной среде с добавлением сирингалдазина, ДМОФ и АБТС в концентрациях 0.1 мМ; 0.5 мМ и 1 мМ. не отличалась от контрольной величины. Однако, на вторые сутки культивирования данные фенольные соединения оказывали ингибирующее действие на активность лакказы (рис. 1).

Исследуемые фенольные соединения стимулировали активность Mn-пероксидазы (рис. 2). Так, максимум ферментативной активности, превышающий контрольные значения в 3 раза, наблюдался на первые сутки культивирования при внесении 0.1 мМ сирингалдазина и 1 мМ ДМОФ. Нами отмечено, что активность Mn-пероксидазы

находится в обратной зависимости от концентраций сирингалдазина и в прямой от ДМОФ, что справедливо как для 24, так и для 36 часов культивирования. Однако, сирингалдазин в концентрации 1 мМ на первые сутки, а также 0.1 мМ и 1 мМ ДМОФ на вторые сутки культивирования снижали Мп-пероксидазную активность. АБТС стимулировал активность Мп-пероксидазы, исключением является ингибирующее действие от внесения 0.1 мМ АБТС на первые сутки выращивания.



**Рисунок 1.** Влияние фенольных соединений на лакказную активность *A. brasilense* Sp245: 1- контроль; 2-сирингалдазин; 3-ДМОФ; 4-АБТС



**Рисунок 2.** Влияние фенольных соединений на Мп-пероксидазную активность *A. brasilense* Sp245: 1- контроль; 2-сирингалдазин; 3-ДМОФ; 4-АБТС

Таким образом, в результате проведенных нами исследований было установлено, что *A. brasilense* Sp245 способен синтезировать лакказу и Мп-пероксидазу. Если принять во внимание многообразие фенольных соединений, то, выбор какого-либо субстрата для характеристики фенолоксидазной активности будет носить произвольный характер. Выбранный нами в качестве субстрата ДМОФ удобен в том отношении, что оба исследуемых фермента способны его окислять. Мы обнаружили, что бактериальные фенолоксидазы работают достаточно медленно, если сравни-

вать, например, с грибными ферментами этого класса. Для разложения фенольного субстрата бактериальной клетке необходимо несколько часов, чтобы накопилось необходимое, для спектрофотометрического определения, количество окрашенных продуктов окисления. Поэтому мы снимали спектры поглощения и анализировали результаты после трех часов инкубирования ферментов с соответствующим фенольным субстратом.

Основываясь на предположении, что бактериальные Мп-пероксидазы и лакказы являются индуцибельными ферментами, мы использовали, в качестве индукторов, вносимых в среду выращивания, фенольные соединения (сирингалдазин, ДМОФ и АБТС). Проведенные нами исследования подтвердили, что активность фенолоксидаз заметно изменяется, реагируя на наличие индукторов при культивировании, причем, активность Мп-пероксидазы в большей степени зависела от присутствия в питательной среде того или иного фенольного соединения, чем активность лакказы. Мы установили, что максимальный стимулирующий эффект на активность Мп-пероксидазы, на первые сутки культивирования оказывают 0.1 мМ сирингалдазин и 1мМ ДМОФ, а на вторые сутки – АБТС в концентрациях от 0.1 до 1 мМ. Тогда как, на активностях лакказы взятые в эксперимент ароматические соединения оказывали ингибирующее действие.

Роль активности лакказ в растительно-бактериальных взаимодействиях исследуется, однако, до настоящего времени вопрос практически не решен. Предполагается, что данные ферменты способны увеличивать у азоспирилл шанс на выживание в ризосфере, так как известно, что защитные реакции растительных тканей в ответ на механическое повреждение и на атаку микроорганизмов связаны с участием фенольных соединений [14]. Что касается Мп-пероксидазы, то в доступной нам литературе мы обнаружили единственную работу, посвященную обнаружению бактериальной Мп-пероксидазы [15]. Функции Мп-пероксидаз бактерий рода *Azospirillum* еще предстоит выяснить. Можно предположить, что вероятнее всего, бактериальные Мп-пероксидазы, наряду с другими фенолоксидазами, способны благоприятно влиять на рост и развитие сельскохозяйственных культур, за счет разрушения токсичных для растений фенольных соединений, находящихся в почве.

Отметим также, что знание способов индукции и повышения активности бактериальных фенолоксидаз дает возможность получения большего количества активных ферментов для дальнейших исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левит М.Н., Шкроб А.М. Лигнин и лигниназа // Био-орган. химия. 1992. Т. 18. С. 309-345.

2. *Ruijsenaars H.J., Hartmans S.* A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. V. 65. P. 177–182.
3. *Rosconi F., Fraguas L.F., Martínez-Drets G., Castro-Sowinski S.* Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium meliloti* // *Enzyme and Microbial. Technology.* 2005. Vol. 36. P. 800–807.
4. *McMahon A.M., Doyle E.M., Brooks S., O'Connor K.E.* Purification and characterisation of tyrosinase and laccase from *Pseudomonas putida* // *Enzyme Microb. Technol.* 2007. Vol. 40. P. 1435–1441.
5. *Givaudan A., Effosse A., Faure D., Potier P., Bouillant M-L., Bally R.* Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: Evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum* // *FEMS Microbiol. Letters.* 1993. Vol. 108. P. 205–210.
6. *Faure D., Bouillant M-L., Bally R.* Isolation of *Azospirillum lipoferum* 4 T Tn5 mutants affected in melanization and laccase activity // *Appl. and Envir. Microbiol.* 1994. Vol. 60, N 9. P. 3413–3415.
7. *Diamantidis G., Effosse A., Potier P., Bally R.* Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum* // *Soil Biol. Biochem.* 2000. Vol. 32. P. 919–927.
8. *Никитина В.Е., Ветчинкина Е.П., Пономарева Е.Г., Гоголева Ю.В.* Фенолоксидазная активность бактерии рода *Azospirillum* // *Микробиология.* 2010. Том 79, №3. С. 344–351.
9. *Sadasivan L., Neyra C.A.* Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation // *J. Bacteriol.* 1985. Vol. 163, N 2. P. 716–723.
10. *Niku-Paavola M., Karhunen E., Salola P., Paunio V.* Ligninolytic enzymes of the white rot fungus *Phlebia radiata* // *Biochem. J.* 1988. Vol. 254. P. 877–302.
11. *Slomczynski D., Nakas J., Tanenbaum S.* Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* // *Appl. Env. Microbiol.* 1995. Vol. 61. P. 907–912.
12. *Leonowicz A., Crzywnowicz K.* Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate // *Enzyme Microbiol. Technol.* 1981. Vol. 3. P. 55–58.
13. *Paszczynski A., Crawford R., Huynh V.-B.* Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification // *Methods Enzymol.* 1988. Vol. 161. P. 264–270.
14. *Запрометов М.Н.* Фенольные соединения растений и их биосинтез. Москва, Итоги науки и техники 1988. 188 с.
15. *Lopes de Oliveira P., Duarte M., Ponezi A., Durrant L.* Purification and partial characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus* sp. // *Brazilian J. of Microbiol.* 2009. Vol. 40. P. 818–826.

## **INDUCERS OF Mn-PEROXIDASE AND LACCASE ACTIVITIES IN AZOSPIRILLUM BRASILENSE SP245**

© 2013 M.A. Kupryashina, E.P. Vetchinkina, E.G. Ponomareva, V.E. Nikitina

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences

We selected inducers for the laccase and Mn-peroxidase activities of the endophytic strain *Azospirillum brasilense* Sp245. The phenol oxidases present in the culture liquid were found to be more active than those found intracellularly. In addition, Mn-peroxidase activity was at least fivefold greater than laccase activity. The oxidative ability of the enzymes was induced by the presence of aromatic compounds in the growth medium.

**Key words:** *Azospirillum brasilense*, phenol oxidases activity, Mn-peroxidase, laccase, inducers.