ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱՅԻ ԶԵԿՈՒՅՑԵՐ
ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

XLIX 1969 5

УК 577.158

БИОХИМИЯ

В. Ц. Айказян, Р. М. Налбандян

Некоторые свойства пигмента из грибов Coriolus versicolor

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Буниятяном 15/V 1969)

Лигниноразрушающие грибы *Coriolus versicolor* при определенных условиях продуцируют в среду значительное количество лакказы (ФК 10.3.2, п-дифенол: O_2 оксидоредуктаза), которая является практически единственным белком, выделяемым грибами в среду. Однако, вместе с этим ферментом в среду выделяются пигменты небелковой природы и, собственно, процедура очистки лакказы сводится к освобождению от этих пигментов и продуктов их конденсации. Природа пигментов и характер их взаимодействия с лакказой во многих отношениях остаются невыясненными.

Целью данной работы было исследование некоторых свойств пигментов, выделяемых в среду вместе с лакказой.

Штамм грибов *Coriolus versicolor* был любезно предоставлен нам Центральной научно-исследовательской лабораторией методов охраны древесины (ЦНИЛМОД). Выращивание культуры проводили по трехступенчатой схеме ([1]). На 5—6 сутки последней стадии выращивания в среду для индукции фермента добавляли сернокислый орто-толуидин (вместо использованного в ([1]) 2,5-ксилидина). Через 10—12 часов после добавления индуктора, культуральная среда окрашивалась в интенсивный фиолетовый цвет, тогда как ферментативная активность, прослеживаемая по окислению пирокатехина, была незначительной. На рис. 1 представлен спектр отфильтрованной культуральной жидкости непосредственно до добавления индуктора (*а*) и спустя 1—2 суток (*б*). Когда ферментативная активность культуральной среды достигала максимального значения, мицеллий удаляли фильтрованием через бумажный фильтр. При общем времени культивирования на последней ступени роста 8—10 суток, выход биомассы составлял 250—300 *г* на 20 литров среды. Для осаждения белка фильтрат насыщали сульфатом аммония. Насыщение сульфатом аммония окрашенного раствора сопровождалось его обесцвечиванием; всплывающая на поверхность густая пена содержала значительное количество фиолетового пигмента. Пену собирали стеклянной ложкой и переносили в 0,1 М фосфатный буфер (pH 6,0). Растворение пены и содержащегося в ней пигмента происходило весьма медленно (в течение нескольких часов), при-

чем пигмент растворялся гораздо хуже белка. Раствор диализовался в течение двух суток против фосфатного буфера. К концу диализа фиолетовый материал в диализных мешочках превращался в гель, который отфильтровывался через бумажный фильтр и высушивался при комнатной температуре. На рис. 2, *а* приведен спектр ЭПР полученного таким образом порошка, записанный при температуре 77°К. Он представляет собой интенсивную широкую асимметричную линию, на которую наложена сравнительно узкая линия ($\Delta H_{max} \sim 30$ эрстед) с g-фактором, равным ~ 2,09. При комнатной температуре интенсивность широкой линии почти не изменялась, тогда как интенсивность узкой линии при этом уменьшалась примерно в 4 раза (рис. 2, *б*). Отфильтрованный гель обладал некоторой оксидазной активностью, которая значительно уменьшалась при его двукратном замораживании и размораживании. Высушенный после такой обработки гель уже почти не обнаруживал узкого сигнала ЭПР, тогда как интенсивность широкого сигнала оставалась неизменной (рис. 2, *в*).

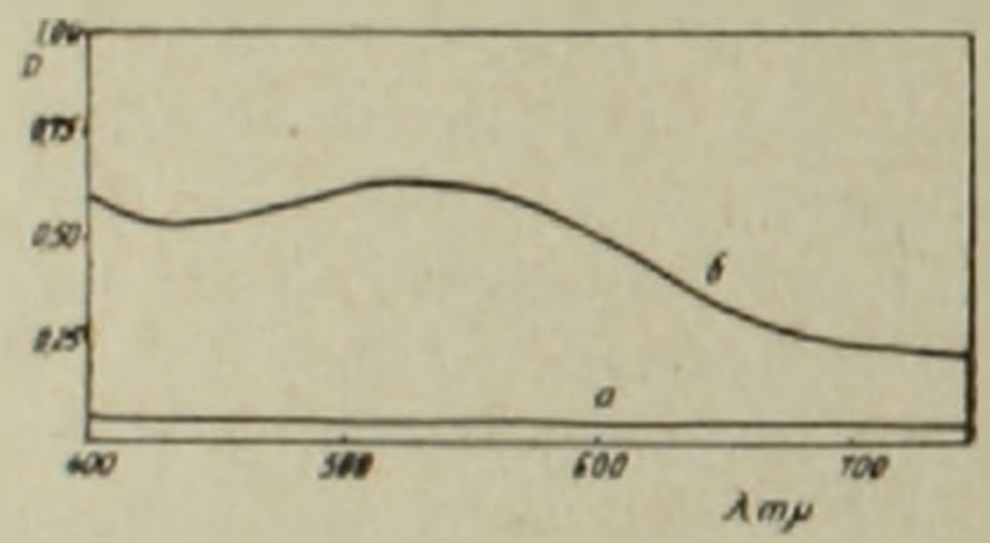

Рис. 1. Спектры оптического поглощения культуральной жидкости ($l = 1$ *см*) непосредственно до добавления индуктора (*а*) и через 1—2 суток (*б*)

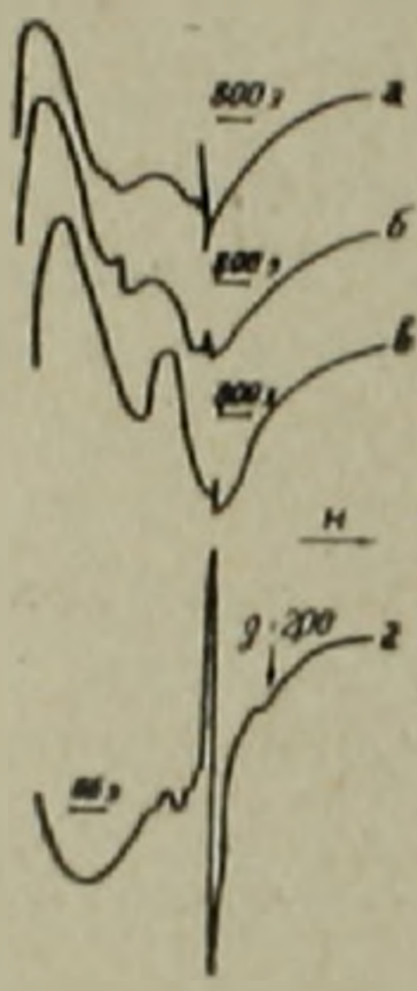

Рис. 2. Спектры ЭПР высушенного геля пигмента при 77°К (*а*) и при комнатной температуре (*б*). (*в*)—записанный при 77°К спектр ЭПР геля, высушенного после двукратного замораживания и (*г*)—спектр ЭПР лакказы, связанной с пигментом

Как показано в работе [1], обработка геля замораживанием-размораживанием приводит к отделению лакказы от пигмента. Поскольку эта обработка сопровождалась резким уменьшением интенсивности узкого сигнала, мы предположили, что этот сигнал принадлежит двухвалентной меди, входящей в состав лакказы. Этот вывод подтверждается качественной реакцией на одновалентную медь с бихинолином восстановленных аскорбатом фильтратов обработанного геля (контролем служили невосстановленные фильтраты), а также типичным сигналом ЭПР лакказы [2], получаемой из фильтратов.

Мы обнаружили, что порошок пигмента хорошо растворяется в спирте. Однако, самые концентрированные спиртовые растворы не да-

вали широкого сигнала ЭПР ни при комнатной температуре, ни при температуре жидкого азота. Параметры широкого сигнала ЭПР и температурная зависимость его интенсивности характерны для соединений, в которых имеется коллективное взаимодействие между атомами железа (ферромагнетизм). Наличие железа в пигменте подтверждается качественной реакцией с фенантролином. Поэтому исчезновение широкого сигнала при растворении, вероятно, можно объяснить разрушением структур, обеспечивающих коллективное взаимодействие. Спиртовые растворы пигмента обесцвечивались восстановителями. (Восстановленные растворы также не обнаруживали сигнала ЭПР). В качестве восстановителей можно использовать цистеин, аскорбат, гидрохинон, пирокатехин, цитрат. Таким образом, окраска пигмента, верятно, связана с его окисленной формой. При подкислении спиртовых растворов пигмент выпадал в осадок; спектр ЭПР такого осадка также представлял собой широкую линию.

Приведенные данные показывают, что образование фиолетового пигмента предшествует продуцированию значительных количеств лакказы. Поскольку пигмент является высокомолекулярным соединением представляется интересным выяснить, возникает ли он в культуральной среде в результате процессов окисления, или полимеризации. Имеющиеся результаты не позволяют в настоящее время однозначно ответить на этот вопрос, однако, связь между окраской и окислительными свойствами пигмента позволяет предположить, что его возникновение связано с окислительными процессами. Связь же лакказы с фиолетовым пигментом, по-видимому, является слабой, поскольку уже двукратное замораживание-размораживание приводит к почти полному отделению фермента от пигмента. Однако то, что лакказа не является просто механическим включением в структуру пигмента, подтверждается различием параметров сигнала ЭПР лакказы до (рис. 2, *г*) и после удаления пигмента ([2]).

Поскольку сам фиолетовый пигмент способен окислять некоторые вещества, являющиеся субстратами лакказы, и образуется по сравнению с лакказой в чрезвычайно больших количествах, имеет смысл говорить о его физиологической роли, заключающейся, вероятно, в предохранении фермента от воздействия неспецифических восстановителей.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Վ. Ս. ՀԱՅԿԱԶՅԱՆ, Ռ. Մ. ՆԱԼԲԱՆԴՅԱՆ

Coriolus versicolor-ից ստացված պիգմենտի մի քանի հատկությունները

Coriolus versicolor *սնկերը որոշակի պայմաններում սկսում են արտադրել լակազա (ֆկ 1.10.3.2. պ-դիֆենոլ։ O_2 օքսիդոռեդուկտազա) ֆերմենտը։ Սակայն ֆերմենտի հետ միասին, որը փաստորեն միակ սպիտակուցն է այդ սիստեմում, սնկերը արտամղում են նաև ոչ սպիտակուցային բնույթի գունավոր պիգմենտներ։*

Պիգմենտի էՊՌ սպեկտրը ներկայացնում է իրենից լայն ասիմետրիկ գիծ, որի վրա վերադրված է համեմատաբար նեղ գիծ (ΔH_{max} ~30 էրստեդ), որի g-ֆակտորը հավասար է ~2,09։

К 77° և 293°К ջերմաստիճաններում դրանցված սպեկտրների համեմատումը հնարավորություն է տալիս եզրակացնել, որ յայն գիծը պայմանավորված է պիգմենտի կազմի մեջ մտնող երկաթի ատոմների կոլեկտիվ փոխներգործությամբ (ֆերոմագնիսական բնույթի), որը խախտվում է պիգմենտը լուծելիս։ 2,09 g-ֆակտոր ունեցող գիծը պատկանում է լակազայի երկվալենտանի պղնձին։

Ելնելով այն փաստից, որ պիգմենտը արտադրվում է լակազայի համեմատությամբ շատ ավելի մեծ քանակով, և որ այն օքսիդացնում է լակազայի սուբստրատներից շատերը, իմաստ ունի խոսել նրա ֆիզիոլոգիական դերի մասին, որը կարող է կայանալ ֆերմենտը ոչ յուրահատուկ սուբստրատների ազդեցությունից պահպանելու մեջ։

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

[1] *G. Fahraeus, B. Reinhammar*, Acta Chem. Scand., 21, 2367 (1967) [2] *B. G. Malmström, B. Reinhammar, T. Vänngård*, Biochim. Biophys. Acta, 156, 67 (1968).