

11. Кассандрова О.Н., Лебедев В.В. Обработка результатов наблюдений. 1970. М.: Наука. с. 86.
12. Lyashchenko A.K. in Relaxation Phenomena in Condensed Matter. Advances in Chem. Phys. Series, ed. I. Prigogine, 1994, vol. 87, p. 246.
13. Lyashchenko A.K., Lileev A.S., Kharkin V.S., Goncharov V.S., Borina A.F. The dielectric relaxation in aqueous acetamide solutions. Mendeleev Commun. 1997. № 58.
14. Лященко А.К., Лилеев А.С., Борина А.Ф. Диэлектрическая релаксация в водных растворах диметилацетамида в интервале температур 288-308 К: Журн. Физ. Хим. 1998, том 72, № 10, с. 1863-1865.
15. Брандт А.А. Исследование диэлектриков на СВЧ. М.: Изд. ИФМЛ, 1963. с. 227-230.
16. Лященко А.К., Харькин В.С., Лилеев А.С., Гончаров В.С. // Журн. Физ. Химии. 1992. Т. 66. с. 2256.
17. Лященко А.К., Лилеев А.С., Борина А.Ф. Диэлектрическая релаксация в водных растворах диметилформамида и диметилмочевины: Журн. Физ. Хим. 1999, том 73, № 8, с. 1382-1387.
18. Лященко А.К. Структура воды, миллиметровые волны и их первичная мишень в биологических объектах. Биомедицинская радиоэлектроника, 2007, № 8-9, с. 62-76.

Сравнение эффективности иммобилизации ксилотрофного базидиомицета на носителях органического и неорганического происхождения

Рябова-Лехмус А.С., д.т.н. проф. Бирюков В.В.
Университет машиностроения
Monic00@yandex.ru

Аннотация. В статье рассмотрена возможность иммобилизации мицелия *Trametes hirsuta* 56 на органических и неорганических носителях в динамическом и статическом режимах. Изучено влияние используемых носителей на синтез экстрацеллюлярного фермента.

Ключевые слова: *Trametes*, иммобилизованный мицелий, лакказы, губки из нержавеющей стали, растительная люфа, древесные стружки.

Целью работы является создание биофильтра с иммобилизованным мицелием базидиомицета для очистки сточных вод, содержащих различные ксенобиотики, в частности красители.

Многие авторы указывают на преимущество иммобилизованных клеток по сравнению со свободными в отношении их использования при биodeградации широкого ряда загрязняющих веществ: активных красителей Remazol black, Reactive Orange, Congo red [2], Direct Violet 51 (DV), Reactive Black 5 (RB), Ponceau Xylidine (PX) [3], Reactive blue 19 [4], Indigo Carmine [5], антрахинонового В49 и азокрасителя R243 [6]. В работе [7] показана ведущая роль лакказы иммобилизованной в альгинатных шариках *Trametes versicolor* при биodeградации азокрасителей: Direct Black 38, Direct Blue 15 (DB15), Direct Orange 26, Direct Green 6 и Direct Yellow.

Доминирующими признаками при отборе носителей являются экологичность и доступность выбранных субстратов, большая удельная поверхность и наличие макропористой структуры, низкая себестоимость. Все эти факторы позволяют обеспечить благоприятные условия для массопереноса, сохранить целостность клеточной стенки, снизив степень нежелательного взаимодействия культуры с неблагоприятной средой, повысить устойчивость клеток к действию инактивирующих факторов, добиться большей концентрации клеток в единице объема.

В настоящее время в мировой практике используют различные сорбенты: и инертные, и

органические; от простых и доступных, таких, как альгинатные шарики [2,5,7-9], губки из полиуретана и нержавеющей стали [5,6,10,11,17], цеолиты [12] до экзотических, как например, куски огнеупорного материала [13].

Материалы и методы

Объектами исследования служили:

- штамм базидиального гриба *Trametes hirsuta* (Wulfen) Pilát – ксилотрофный базидиомицет, промышленный сверхпродуцент внеклеточной высокопотенциальной лакказы [15];
- носители органической природы: растительная люфа, костра льна, подсолнечная лузга, дубовые, липовые и сосновые стружки [16].
- носитель неорганической природы: губки из нержавеющей стали.

Штаммы выращивали методом глубинного культивирования в колбах Эрленмейера объемом 750 мл с объемом среды 100 мл на круговой качалке ($n = 200$ об/мин) при температуре $32\text{ }^{\circ}\text{C}$. Среда имела следующий состав (г/л): мука пшеничная - 29; KH_2PO_4 - 1,3; NH_4NO_3 - 2,0; кукурузный экстракт - 6,4; ионы Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , pH среды 5,6 – 5,8. Первый пассаж получали спустя 5 суток культивирования при внесении в среду культуры, сохраненной на сусле-агаре. Последующие пассажи - спустя 3 суток при внесении глубинной культуры предыдущего пассажа в количестве 10% по объему. Все эксперименты проводили с использованием культуры II пассажа.

Определение оксидазной активности лакказы в глубинной культуре (ОА) проводили при 410 нм на спектрофотометре Shimadzu UVmini1240 (Япония). В кювету общим объемом 3 мл вносили 2 мл 0,1 М цитрат-фосфатного буфера (pH 4,5), 500 мкл пирокатехина (10^{-2} М), в качестве субстрата, и 25 мкл пробы. Изменение оптической плотности раствора определяли за 1 мин. За единицу оксидазной активности (ЕОА) принимали изменение оптической плотности реакционной смеси при 410 нм за 1 мин в пересчете на 1 мл раствора культурального фильтрата. Для данных условий определения активности 1 ЕОА равна 3,38 МЕ/мл или $5,63 \cdot 10^{-8}$ kat.

Концентрацию биомассы

- в глубинной культуре определяли на влагомере SARTORIUS (MA 45) с использованием бумажных фильтров, вес которых был доведен до постоянного.
- закрепленную на носителях, определяли в сушильном шкафу при температуре $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ с учетом вычета абсолютно сухого веса носителя и внесенного посевного материала.

Абсолютно сухой вес носителей определяли на влагомере SARTORIUS (MA 45), измеряя процентное содержание выпаренной влаги и проводя вычисления по формуле:

$$m_{\text{АСВ}} = m_{\text{нач}} \cdot (100 - \varphi), \quad (1)$$

где: φ – количество выпаренной влаги, %.

Порозность слоя загрузки определяли с использованием мерного цилиндра, куда вносили необходимое количество наполнителя с требуемой плотностью набивки. После этого заливали носители эквивалентным объемом воды и через 5 минут определяли суммарный объем наполнителя и воды. Порозность слоя загрузки рассчитывали по формуле:

$$\varepsilon = [2 - b/a] \cdot 100\%, \quad (2)$$

a – первоначальный объем носителя с порами, заполненными воздухом, см^3 ;

b – объем носителя с эквивалентным количеством воды, см^3

Статистическую обработку данных проводили общепринятым методом с использованием t – критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Иммобилизация в статическом и динамическом режимах

Иммобилизацию мицелия *Trametes hirsuta* 56 в динамических условиях на указанных носителях осуществляли в течение 10 суток на круговой качалке ($n = 200$ об/мин) при температуре $t = 32\text{ }^{\circ}\text{C}$ в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, куда предварительно вносили стерильные носители (50 см^3), 150 мл питательной среды оптимизированного состава и 0,5% (по

объему) посевного материала (ПМ).

Предварительная обработка всех исследуемых носителей заключалась в их стерилизации ($p=1$ ати, $t=20$ мин). Люфу и стальные губки измельчали на блоки размером 25х3 мм и 15х3 мм, после чего их подвергали кипячению в течение 30 и 10 мин соответственно и промывке дистиллированной водой. Все вносимые носители усредняли по объему.

Иммобилизацию на костре льна, подсолнечной лузге, липовой стружке осуществить не удалось.

Геометрическая структура растительной люфы и стальных губок обеспечивала благоприятные условия для массопереноса. Эффективность иммобилизации оценивали по приросту биомассы и отсутствию свободно плавающего мицелия.

Таблица 1

Оценка эффективности иммобилизации *Trametes hirsuta* 56 на губках из нержавеющей стали и растительной люфе в динамических условиях.

№ п/п	Носитель	Прирост биомассы, г/г _{АСВ} носителя
1	Стальные губки	0,53 ± 0,09
2	Растительная люфа	2,17 ± 0,08

Иммобилизация на стружках сосны и дуба не позволяет говорить о положительном результате ввиду образования плотного комка. Однако отсутствие плавающего в жидкости мицелия позволяет судить о его закреплении на носителях.

Полученные данные позволили перейти к иммобилизации мицелия в статических условиях при оптимальной температуре. В этих условиях процесс осуществляли в течение 14 дней.

Носители, взятые в объеме 100 см³, что составляло для подсолнечной лузги – 4 г, костры льна – 4 г, сосновых, дубовых, липовых стружек – 6 г, 5 г, 3,5 г, соответственно, ($\epsilon = 96\%$), инокулировали 10 мл ($0,2 \pm 0,005$ г АСВ) посевного материала и 10 мл жидкой питательной среды.

Закрепления мицелия на костре льна и подсолнечной лузге, как и в динамических условиях, не происходило. Отмечался поверхностный рост культуры, который выражался сначала в появлении четко различимых отдельных белых пеллет гриба диаметром около 1.5 мм, а затем в полном обрастании поверхности носителя белым воздушным мицелием. При этом носитель слеживался в плотный комок. Без обеспечения контакта с водной фазой происходило лишь опущение носителя с образованием отдельных пеллет.

Наибольшее родство базидиомицета отмечено к сосновым и дубовым стружкам. Мицелий активно колонизировал носители не только на поверхности, но и внутри пор. Культура не закреплялась на древесине липы.

В дальнейших исследованиях оценивали эффективность иммобилизации на различных сочетаниях стружек. Носители испытывали в равных количествах по объему (100 см³) с одинаковой порозностью загрузки ($\epsilon = 96\%$). В случае смешанных насадок стружки различных пород вносили в равных соотношениях. Об эффективности иммобилизации мицелия судили по увеличению грибной биомассы за определенный период культивирования в пересчете на 1 г АСВ носителя. Результаты эксперимента сведены в таблицу 2.

Одно из возможных объяснений избирательного отношения культуры к используемым органическим носителям связано с различием химического состава древесины используемых пород. В древесине лиственных пород преобладают пентозаны, а содержание лигнина и целлюлозы ниже, чем у хвойных пород. *Trametes hirsuta* 56, представитель грибов белой (коррозионной) гнили, вступая во взаимодействие с древесиной, затрагивает главным образом лигнин, в меньшей степени - целлюлозу. Интересен тот факт, что содержание смолистых веществ в древесине составляет в среднем 5,4 % (от АСВ), в дубовой и липовой древесине на

Оценка эффективности иммобилизации *Trametes hirsute* 56 на опытных образцах стружек различных пород и их сочетаний в статическом режиме

№ п/п	Носитель	Влажность	Прирост биомассы, г/г _{АСВ} носителя
1	Липа	3,53 ± 0,38	Отсутствует
2	Дуб	4,80 ± 0,48	1,45 ± 0,09
3	Сосна	6,54 ± 0,69	2,31 ± 0,08
4	Дуб + липа	3,91 ± 0,36	Отсутствует
5	Липа + сосна	4,44 ± 0,38	Отсутствует
6	Дуб + сосна	6,23 ± 1,03	1,86 ± 0,08
7	Дуб + липа + сосна	5,23 ± 0,62	Отсутствует

Примечание. Все носители взяты в равном объемном соотношении

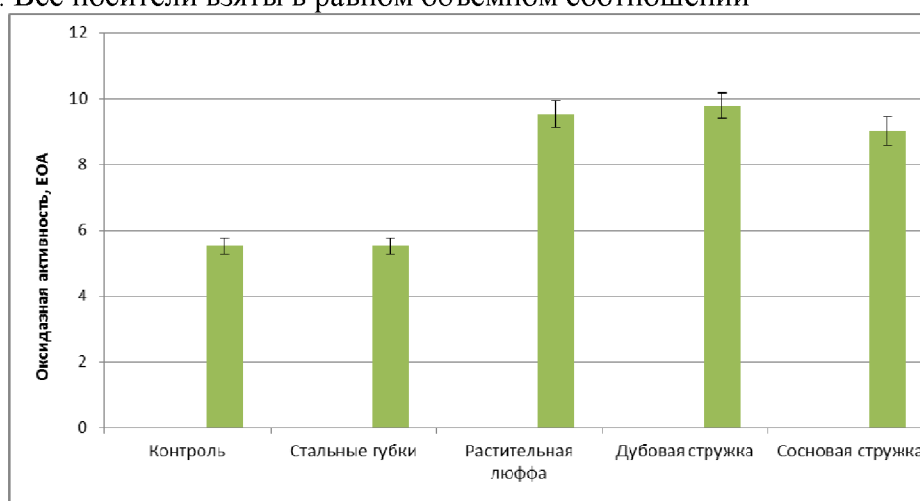


Рисунок 1 – Влияние различных носителей на величину оксидазной активности лакказы

Влияние органических и неорганических носителей на синтез фермента

Помимо основной функции, все органические носители, пригодные для иммобилизации, оказались индукторами синтеза внеклеточной лакказы. Стальные губки не инициировали выход фермента.

Эксперимент осуществляли в динамическом режиме. Контрольные колбы инокулировали 150 мл питательной среды оптимизированного состава и 10 % (об) мицелиальной взвеси.

Оксидазную активность изучали в динамике, максимальный выход фермента зафиксирован на 4 сутки эксперимента.

Заключение

Проведен скрининг носителей органического и неорганического происхождения с целью их использования для иммобилизации мицелия ксилотрофного базидиомицета.

Осуществлена иммобилизации мицелия в статическом и динамическом режимах.

Оценена эффективность иммобилизации.

Показано, что эффективность иммобилизации зависит от макроскопической структуры и химического состава носителя.

Изучено влияние используемых носителей на способность инициировать синтез внеклеточной лакказы.

На основании полученных данных растительная люфа, сосновые и дубовые стружки отобраны как перспективных носители для иммобилизации в области очистки сточных вод, загрязненных красителями.

Литература

1. Ефременко Е.Н., Лягин И.В., Завьялов В.В. и др. Ферменты в технологии уничтожения фосфорорганических отравляющих веществ // Рос. хим. ж. 2007. Т. L1. № 2. с. 24-29.
2. Dayaram P., Dasgupta D. Decolorization of synthetic dyes and textile wastewater using *Polygopus rubidus* // J. Environ. Biol. 2008 Nov; V.29 (6): P.831-6
3. Enayatzamir K., Alikhani H.A. et. al. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized into alginate beads //Envir. Sci. Pollut. Res. Int. – 2010.-17(1). P. 154-153
4. Champagne P.P., Ramsay J.A. Reactive blue 19 decolorization by laccase immobilized on silica beads //Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007 Dec; V. 77(4). P.819-823
5. Rodríguez Couto S, Sanromán M.A., Hofer D., Gübitz G.M. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsute* for decolourization of textile dyes// Bioresour. Technol. 2004 Oct; V. 95. P. 67-72.
6. Casieri L., Varese G.C., Anastasi A. et al. Decolorization and detoxication of reactive industrial dyes by immobilized fungi *Trametes pubescens* and *Pleurotus ostreatus* //Folia. Microbiol. 2008; V.53(1). P.44-52
7. Ramsay J.A., Mok W.H., Luu Y.S., Savage M. Decoloration of textile dyes by alginate-immobilized *Trametes versicolor* //Chemosphere. 2005 Nov; 61(7):956-964.
8. Pazarlioglu N.K., Akkaya A., Akdogan H.A., Gundor B. Biodegradation of Direct Blue 15 by free and immobilized *Trametes versicolor* // Water. Environ. Res. 2010Jul; V.82. N.7.P.579-585
9. Wu J., Yu H.Q. Biosorption of 2,4-dichlorophenol by immobilized white-rot-fungus *Phanerochaete chrysosporium* from aqueous solutions // Bioresour. Technol. 2007 Jan; V.98. P. 253-259.
10. Font X., Caminal G. et.al. Treatment of toxic industrial wastewater in fluidized and fixed-bed batch reactors with *Trametes versicolor*: influence of immobilization // Environ. Technol. 2006 Aug; V.27. N.8. P.845-854
11. Krishna Prasad K., Venkata Mohan S. et. al. Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions // J. Microbiol. 2005 Jun; Vol. 43. No 3. P. 301-307
12. Cabana H., Alexandre C., Agathos S. N., Jones J. P. Immobilization of laccase from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona* and use of the immobilized biocatalyst for the continuous elimination of endocrine disrupting chemicals // Bioresour. Technol. 2009 Jul; V.100. P. 3447-3458.
13. Sharma D.K., Saini H.S., Singh M. et.al. Biotreatment of simulated textile dye effluent containing malachite green by an up-flow immobilized cell bioreactor // World Journal of Microbiology and biotechnology. 2004 Jun; V.20. P.431-434.
14. Chivukula M., Renganatham V. Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae* // Appl. Environ. Microbiol. 1995 Dec; V.61 (12). P.4374-4377
15. Патент РФ на изобретение № 2345135 «Штамм базидиального гриба *Trametes hirsute* (Wulfen) Pilát – продуцент голубой лакказы». // Горшина Е.С., Бирюков В.В. и др. – Оpubл. в 2009
16. Iqbal M., Saeed A., Edyvean R.G. et. al. Production of fungal biomass immobilized loofa sponge (FBILS)-discs for the removal of heavy metal ions and chlorinated compounds from aqueous solution// Biotechnol. Lett. 2005 Sep; V. 27. P. 1319-1323.
17. Hernández J., Pradp O.J., Almarcha M., et. al. Development and application of a hybrid inert/organic packing material for the biofiltration of composting off-gases mimics // J Hazard Mater. 2010 Jun; V.178. P. 665-672.