



Biodegradacja wybranych związków organicznych przy użyciu organizmów *White Rot Fungi* (cz. I)

Iwona Krzyżewska, Aleksandra Kozarska

Obecnie obserwowany jest wzrost stężenia związków organicznych, farmaceutyków i środków higieny osobistej w środowisku wodnym, które stanowią balast w oczyszczalniach ścieków. Poszukiwane są wciąż nowe metody i sposoby oczyszczania ścieków oraz usunięcia wysokich stężeń ksenobiotyków ze środowiska wodnego. Grzyby z rodzaju *White Rot Fungi* wydzielają enzymy ligninolityczne, takie jak: peroksydaza ligninowa, peroksydaza manganowa oraz lakaza, które zdolne są do biodegradacji trwałych związków organicznych, związków organicznych o złożonej budowie oraz budowie podobnej do struktury ligniny.

Wstęp

W ostatnich latach obserwowany jest ciągły rozwój biotechnologii, mikrobiologii oraz biochemii. Ze względu na wciąż wzrastające potrzeby w tych dziedzinach, konieczne jest prowadzenie badań nowoczesnymi technikami, które pomogą w opracowaniu skutecznych metod walki z chorobami, zanieczyszczeniem środowiska oraz tworzeniu nowych farmaceutyków. Problem zanieczyszczenia środowiska wciąż stanowi duże zagrożenie. Mają na to wpływ między innymi: fabryki i zakłady produkcyjne, które emitują do powietrza duże ilości lotnych związków chemicznych; wzmożona kongestia która przyczynia się do obecności spalin samochodowych w atmosferze; wzrastająca liczba przyjmowanych antybiotyków i innych farmaceutyków, które trafiają w formie zmetabolizowanej i pierwotnej do

środowiska wodnego powodując wzrost odporności bakterii; trwałe zanieczyszczenia organiczne, czyli związki, których rozkład jest trudny z powodu odporności na czynniki biologiczne i chemiczne [1]. Opracowywane są wciąż różne metody rozkładu trwałych zanieczyszczeń organicznych, takie jak bioremediacja, biodegradacja, flokulacja itd. W metodach rozkładu związków organicznych zastosowanie znajdują grzyby białej zgnilizny – *White Rot Fungi*. Organizmy te, ze względu na wydzielanie specjalnych enzymów, są zdolne do rozkładu związków chemicznych o skomplikowanej strukturze. Grzyby białej zgnilizny wytwarzają enzymy ligninolityczne, które biorą udział w biodegradacji ligniny. Ostatnie badania wskazują na ich szerokie spektrum możliwości i zdolność do biodegradacji również trwałych zanieczysz-

czeń organicznych, takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, policykliczne bifenole, farmaceutyki i pestycydy [1, 2, 3, 4, 5].

Celem artykułu jest charakterystyka grzybów białej zgnilizny, przedstawienie mechanizmu działania najważniejszych enzymów wydzielanych przez te organizmy oraz zwrócenie uwagi na zastosowanie ich w procesie biodegradacji niektórych związków organicznych.

Charakterystyka grzybów białej zgnilizny (*white rot fungi*)

Rozkład drewna jest niezwykle istotnym i złożonym zjawiskiem w procesach przemiany węgla i obiegu składników odżywczych w środowisku leśnym, regulowanym przez rozmaite czynniki: klimat, jakość podłoża i liczebność, skład i aktywność organizmów powodujących rozkład [6].

Ze względu na dużą ilość ligniny, obumarłe drzewa ulegają utrudnionemu rozkładowi. W naturalnych warunkach tylko grzyby – w sposób istotny – mają zdolność do ich rozkładu. Z uwagi na zdolność grzybów do wydzielania oksyreduktaz i hydralaz są uważane za główne organizmy rozkładające drewno, przy czym tylko w tej grupie występują jednostki, mające zdolność rozkładu ligniny. Rozmaite bakterie również zasiedlają obumarłe drzewa i wykazują co najmniej oddziaływanie komensalne z grzybami zamieszkującymi drzewa, dostarczając dodatkowo azot. Jednak ze względu na ich ograniczoną zdolność do rozkładu kompleksów polimerowych lignoceluloz, bakterie odgrywają pomniejszą rolę w rozkładzie drewna [6]. Zgnilizna jako wynik działania grzybów rozkładających drewno, może zostać sklasyfikowana w zależności od typu



Tabela 1. Charakterystyka poszczególnych rodzajów zgnilizn [8]

Typ	Przedstawiciele	Kolor	Tekstura	Chemizm działania
Biała zgnilizna drewna	Grzyby podstawkowe (Basidiomycota)	± wybielony	Włóknista	Wszystkie związki usunięte
Brunatna zgnilizna drewna	Grzyby konidialne (Deuteromycota)	± brunatny	Włóknista struktura zostaje utracona we wczesnym stadium, struktura „szachownicy”	Głównie usunięte węglowodany, pozostają w większości ligniny
Miękka zgnilizna drewna	Grzyby workowe (Asco) i grzyby konidialne (Deuteromycota)	± wybielony lub brunatny	Zazwyczaj na powierzchni, częściowo utracona struktura włóknista, struktura „szachownicy” w niektórych przypadkach	Przede wszystkim węglowodany, ale też utrata niektórych lignin

rozkładu. Najpowszechniejsza klasyfikacja obejmuje podział na zgniliznę brunatną, miękką i białą [7] (Tabela 1).

Grzyby białej zgnilizny drewna rozkładają ligninę i celulozę, często pozostawiając drewno wilgotne, miękkie, gąbczaste, włókniste w kolorze białym lub żółtym [7]. Włóknista struktura zgnilizny białej wynika z pozostawienia celulozy w nienaruszonym stanie aż do bardzo późnego stanu rozkładu [8]. Typowo charakteryzuje się ona mniejszą włóknistością w obrębie drewna twardego aniżeli drewna miękkiego w związku z występowaniem krótszych włókien w twardym drewnie. Drewno zazwyczaj ulega bieleńniu poprzez utlenienie i utratę ligniny, które są zazwyczaj nieznacznie brunatne [8].

Grzyby brunatnej zgnilizny drewna rozkładają hemicelulozę i celulozę. Celuloza jest rozkładana przez nadtlenek wodoru (H₂O₂), produkowany podczas rozpadu hemicelulozy. Ponieważ nadtlenek wodoru jest niewielką cząsteczką, szybko ulega dyfuzji w drewnie, prowadząc do rozkładu, który nie ogranicza się tylko do bezpośredniego sąsiedztwa strzępek grzyba [3]. W rezultacie tego typu rozkładu drewno kurczy się,

wykazuje brunatne odbarwienia, formułują się pęknięcia i uszkodzenia [7].

Grzyby miękkiej zgnilizny drewna wydzielają celulazę ze strzępek, enzym rozkładający celulozę w drewnie. Prowadzi to do formowania mikroskopijnych wgłębień wewnątrz drewna, czasem do odbarwienia i spękań jak w przypadku brunatnej zgnilizny drewna. Grzyby miękkiej zgnilizny drewna wymagają związanego azotu do produkcji enzymów, który pozyskiwany jest z drewna lub środowiska. Ten typ grzybów potrafi dostosować się do warunków, które są zbyt gorące, zimne lub wilgotne dla grzybów zgnilizny brunatnej lub białej. Posiadają również zdolność rozkładu wielu związków, które są odporne na biologiczne oddziaływanie. Kora w roślinach drzewiastych zawiera wysokie stężenia taniny, która jest trudnorozkładalna dla grzybów, oraz suberyny, tworzącej barierę dla mikroorganizmów. Kora stanowi ochronę dla bardziej wrażliwych wewnętrznych części rośliny. Grzyby miękkiej zgnilizny drewna nie wykazują tendencji do rozkładu materii w tak efektywny sposób jak dokonują tego grzyby, powodujące zgniliznę białą [7].

Mechanizm działania grzybów

W środowisku obecne są trwałe zanieczyszczenia organiczne, których cechuje wysoka odporność na czynniki biologiczne i chemiczne. Związki te również rzadko ulegają procesowi biodegradacji, konieczna jest bowiem obecność enzymów, które posiadają zdolność rozkładu związków chemicznych o złożonej strukturze. Enzymami stosowanymi do degradacji trudno rozkładających się związków organicznych są między innymi substancje pochodzące z grzybów white rot fungi – grzybów białej zgnilizny. Organizmy te produkują bowiem enzymy ligninolityczne, które są zdolne do biodegradacji polimerów ligniny. Są one również stosowane do degradacji takich związków organicznych jak: wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, polichlorowane bifenyle, podstawione fenole, dioksyny, chloroaniliny czy złożone ksenobiotyki aromatyczne [1].

Do grupy tych enzymów należą między innymi: peroksydaza ligninowa, peroksydaza manganowa, oraz lakaza. Peroksydaza ligninowa (LiP) jest jednym z najważniejszych enzymów wydzielanych przez

grzyby z rodzaju *White Rot Fungi*. Charakteryzuje się niską specyficznością substratową co oznacza, że może się łączyć z wieloma substratami lub ich analogami. Głównymi substratami są związki organiczne o złożonej budowie chemicznej, np. WWA, PCB, czy ksenobiotyki. Działanie enzymu oparte jest na obecności H₂O₂, którego redukcja prowadzi do jednoczesnego utlenienia substratów organicznych. Częściami peroksydazy ligninowej są hemoproteiny, zawierają one w swej budowie hem, który jest centrum aktywnym enzymu. Stanowią one również barierę ochronną komórek przed stresem oksydacyjnym [1].

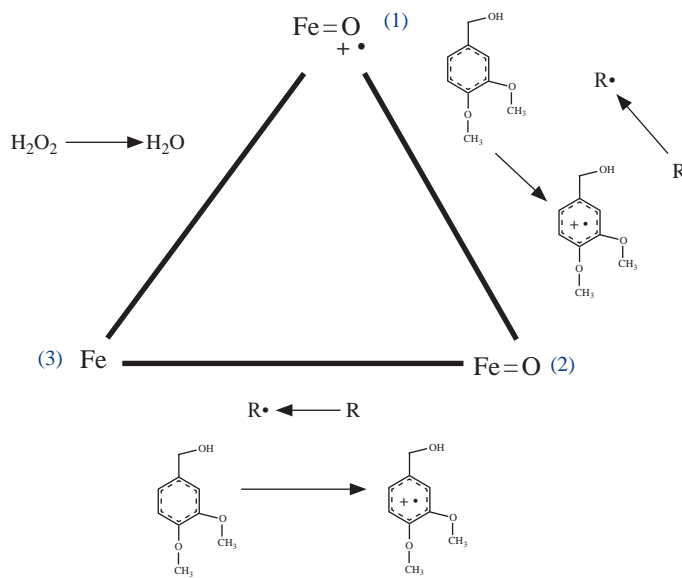
Dzięki swoim właściwościom i zdolności do biodegradacji związków organicznych, peroksydaza ligninowa (LiP) powoduje, m.in. otwarcie pierścienia aromatycznego, dimetylację, dimeryzację fenoli, oraz rozerwanie wiązań C-C poprzez generowanie wolnych rodników [1, 2]. Mechanizm działania LiP obrazuje schemat 1. Grupa hemo- wa pod wpływem H₂O₂ jest utleniana i tworzy kompleks (1), następuje utlenianie związków organicznych, prowadząc do tworzenia wolnych rodników ich form, co powoduje



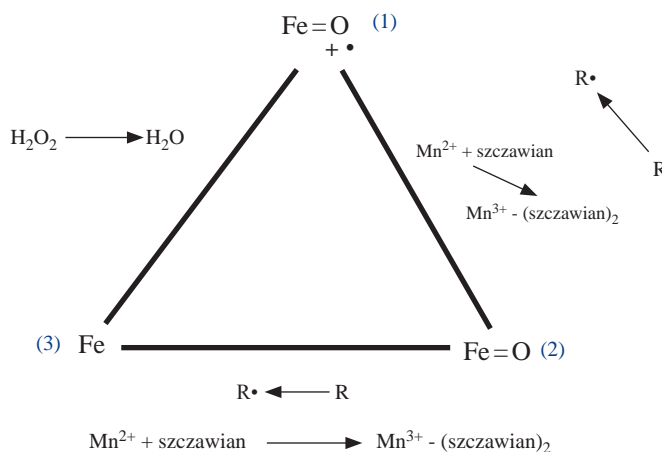
tworzenie kompleksu (2), po czym kompleks (3) jest redukowany do pierwotnej formy żelaza (kompleks III) [2].

Masa cząsteczkowa peroksydazy ligninowej wynosi od 38 do 43 kDa, a dodatkową zaletą tego enzymu jest jego niski zakres pH. Dzięki takim właściwościom enzymu, możliwe jest również degradowanie niefenolowych związków, amin i aromatycznych estrów [3, 9]. Cząsteczki peroksydazy ligninowej mogą wnikać do wnętrza komórki i tam utleniać polimery ligniny.

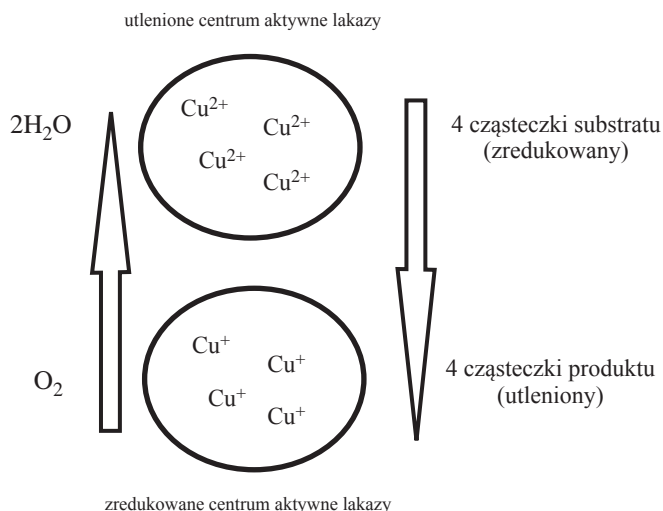
Peroksydaza manganowa, zwana również peroksydazą manganozależną (MnP) jest drugim istotnym enzymem wydzielanym przez grzyby białej zgnilizny. Peroksydaza ta jest zależna od obecności jonów manganu (Mn(II)). Utlenianie lignin lub innych związków organicznych polega na tworzeniu kompleksu organicznego z jonem Mn(II) oraz dyfundowaniu kompleksu od enzymu. Mechanizm działania tego enzymu nie został dokładnie zbadany jak w przypadku peroksydazy ligninowej, jednakże badania wykazują szersze spektrum substratów tego enzymu oraz zależność od obecności odpowiedniego buforu. Budowa chemiczna manganozależnej peroksydazy jest bardzo zbliżona do peroksydazy ligninowej, jednak masa cząsteczkowa MnP jest większa i wynosi od 45 do 60 kDa. Mechanizm peroksydazy manganowej jest podobny do peroksydazy ligninowej i obrazuje go schemat 2. Utlenianie manganu z Mn(II) do Mn(III) następuje poprzez wytworzenie kompleksu z kwasem organicznym, który działa jak stabilizator Mn(III). Kompleks ten jest z kolei silnym utleniaczem i może opuścić centrum aktywne enzymu, samodzielnie utleniając inne związki organiczne. Enzym MnP generuje również wolne rodniki fenolowe, które rozpoczynają mechanizmy reakcji np. depolimeryzacji. Peroksydaza manganowa nie jest jednak zdolna do degradacji niepieścienionych odcinków w budowie ligniny [1, 3].



Schemat 1. Działanie peroksydazy ligninowej (na podstawie [2])



Schemat 2. Działanie peroksydazy manganowej (na podstawie [2])



Schemat 3. Działanie lakazy (na podstawie [10, 11])

zanie kompleksu z kwasem organicznym, który działa jak stabilizator Mn(III). Kompleks ten jest z kolei silnym utleniaczem i może opuścić centrum aktywne enzymu, samodzielnie utleniając inne związki organiczne. Enzym MnP generuje również wolne rodniki fenolowe, które rozpoczynają mechanizmy reakcji np. depolimeryzacji. Peroksydaza manganowa nie jest jednak zdolna do degradacji niepieścienionych odcinków w budowie ligniny [1, 3].

Lakaza jest enzymem należącym do oksydoreduktaz, występujących w roślinach, bakteriach i grzybach. Katalizuje one reakcje utleniania związków organicznych i nieorganicznych przy jednoczesnej redukcji tlenu cząsteczkowego do wody (Schemat 3). Cząsteczka enzymu lakazy jest zbudowana z czterech atomów miedzi. Każdy atom miedzi pełni tutaj swoją funkcję. Typ I odpowiedzialny jest za utlenianie substratu, Typ II oraz dwa atomy miedzi z Typu III tworzą zespół, w którym zachodzi wiązanie i redukcja tlenu cząsteczkowego do wody. W reakcji utleniania substratów powstają reaktywne rodniki, które rozpoczynają reakcje nieenzymatyczne, reakcje utleniania, oraz sprzęgania się form rodnikowych substratów [11]. Ze względu na obecność atomów miedzi, lakaza ma niebieską barwę i jest nazywana niebieską oksydoreduktazą [10]. Stosowana jest w biodegradacji PCB, WWA, usuwania wysokich stężeń fenoli, detoksykacji środowiska, usuwaniu fenoli, trichlorofenolu, pestycydów i innych ksenobiotyków [1, 3].