

# МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЛАККАЗЫ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ЛИГНОЛИТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА ГРИБА *PANUS TIGRINUS*. pH ЗАВИСМОСТЬ РАБОТЫ ФЕРМЕНТА

Фурсова П. В., Надежина О. С., Лаврова А. И.,  
Кадималиев Д. А., Ризниченко Г. Ю.

(Россия, Москва, Саранск)

*Предложена схема каталитического цикла работы лакказы – одного из ключевых ферментов внеклеточного лигнолитического ферментного комплекса гриба *Panus tigrinus*. При построении учтена зависимость активности фермента от уровня pH среды. Получена зависимость максимальной скорости работы фермента от концентрации протонов в среде.*

**Введение.** За последние два десятка лет сформировались и получили мощное развитие биологические технологии, направленные на использование процессов жизнедеятельности живых организмов для получения промышленным способом ценных продуктов. Одна из областей промышленности, где чрезвычайно широко стали применять биотехнологии, – это обработка древесины. Главная причина такой востребованности – возможность повысить экологическую безопасность производства бумаги, а также утилизация отходов деревообрабатывающих предприятий путем производства безопасных для здоровья человека древесных пластиков, биоклеев и других материалов.

Одним из основных «инструментов» этого направления биотехнологии являются грибы белой гнили (представители рода *Hymenomyces*, *Phanerochaete*, *Coriolus*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Phlebia*, *Panus*, в частности *Panus tigrinus*). Грибы белой гнили – наиболее распространенные разрушители древесины в природе.

Это единственные организмы, способные разлагать лигнин (одну из главных составляющих древесины) до углекислого газа и воды.

**Биодеградация лигнина грибами белой гнили.** Разложение древесины происходит под действием большого набора ферментов, действующих на ее различные компоненты. Первичная атака грибов на растительную ткань направлена на пектиновые вещества клеточных стенок. Ее осуществляет набор ферментов пектиназ. После действия пектиназ доступными ферментативному гидролизу оказываются другие компоненты клеточной стенки, в частности, целлюлоза. Затем, после действия целлюлаз, деградации подвергается лигнин. Клетки мицелия гриба выделяют группу ферментов – ВЛФК – внеклеточный лигнолитический ферментный комплекс. ВЛФК грибов белой гнили включает: лакказы – медьсодержащую фенолоксидазу – и пероксидазы (Mn-пероксидазу и лигнинпероксидазу), причем для разных грибов ключевым ферментом являются различные ферменты этого комплекса. В частности, для гриба *P. Tigrinus* – это лакказа и лигнинпероксидаза.

**Математическая модель работы лакказы.** Известно, что субстратом для фермента лакказы является лигнин, олигофенолы, конечным продуктом – монофенолы и карбоксильные производные. Его активность зависит от уровня pH среды. Согласно экспериментальным данным [1-3] построена схема каталитического цикла лакказы (рис. 1).

Ферментативный цикл характеризуется следующими особенностями:

- 1) фермент может находиться в четырех формах: «обычной» ( $E$ ); в комплексе с субстратом-лигнином ( $ES$ ), от которого отщепляется продукт-олигофенол  $P_1$ , а затем через промежуточный комплекс  $EP_2$  – продукт-монофенол  $P_2$ ; и в комплексе ( $EP_3$ ), который образуется в результате присоединения к ферменту субстрата-олигофенола, а ре-

зультатом его распада являются карбоксильные соединения  $P_3$ ;

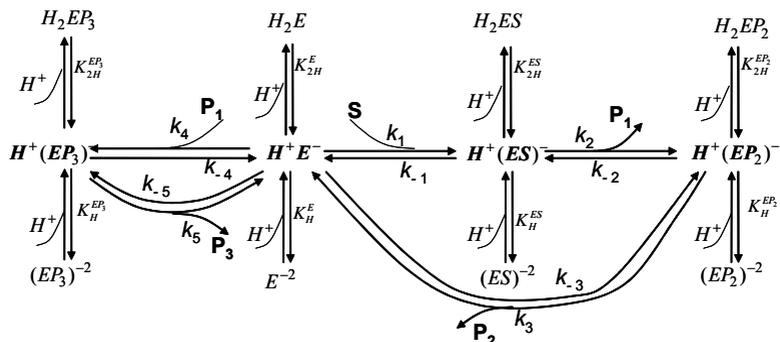


Рис. 1. Схема каталитического цикла лакказы. Обозначения в тексте

- 2) каждая из трех форм фермента может обратимо протонироваться ( $H^+$ ) и дважды протонироваться ( $H^+E^-$ ,  $H_2E$ ,  $H^+E_1^-$ ,  $H_2E_1$ ,  $H^+E_2^-$ ,  $H_2E_2$ );
- 3) предполагаем, что реакции протонирования – депротонирования находятся в быстром равновесии ( $K_H^E$ ,  $K_{2H}^E$ ,  $K_H^{ES}$ ,  $K_{2H}^{ES}$ ,  $K_H^{EP_2}$ ,  $K_{2H}^{EP_2}$ ,  $K_H^{EP_3}$ ,  $K_{2H}^{EP_3}$  – константы равновесия);
- 4) в ферментативном цикле активны формы фермента, протонированные одним протоном;
- 5) так как фермент может неспецифически связывать любое фенольное соединение, предполагается, что в качестве субстрата одновременно выступает и лигнин ( $S$ ), и олигофенолы ( $P_1$ ) ( $k_1, k_{-1}, k_4, k_{-4}$ , – константы прямых и обратных реакций);
- 6) при расщеплении лигнина выделяются олигофенолы  $P_1$ ; при связывании олигофенолов выделяются либо карбоксильные соединения  $P_3$ , либо происходит образование мо-

нофенола  $P_2$  с возвращением фермента в начальное состояние ( $k_2, k_{-2}, k_5, k_{-5}, k_3, k_{-3}$  – константы прямых и обратных реакций)

Работа фермента в большой степени зависит от внешних условий, например от температуры и давления. Однако наиболее интересным и актуальным является исследование зависимости активности фермента от уровня pH среды.

Предполагается, что процессы протонирования-депротонирования, входящие в ферментативный цикл лакказы (рис. 1), сильно отличаются по своим характерным временам. Это обстоятельство позволяет упростить схему, заменив формы фермента, отличающиеся разной степенью протонирования, их суммарными концентрациями. При этом в константы скоростей реакций необходимо ввести соответствующий множитель [4]. Например, теперь на первой стадии в реакцию с субстратом  $S$  вступает суммарная концентрация  $E^* = H^+E^- + E^{-2} + H_2E$ , образуя комплекс

$$k_1^* = \frac{k_1}{\left(1 + \frac{K_H^E}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_{2H}^E}\right)}, \text{ где } [H^+]$$

– концентрация протонов в среде.

Стационарные концентрации форм фермента определяются из системы алгебраических уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dES^*}{dt} = 0 = E \cdot S \cdot k_1^* + EP_2 \cdot P_1 \cdot k_{-2}^* - ES^* \cdot k_{-1}^* - ES^* \cdot k_2^*, \\ \frac{dEP_2^*}{dt} = 0 = ES \cdot k_2^* + E \cdot P_2 \cdot k_{-3}^* - EP_2^* \cdot P_1 \cdot k_{-2}^* - EP_2^* \cdot k_3^*, \\ \frac{dEP_3^*}{dt} = 0 = E \cdot P_1 \cdot k_4^* + E \cdot P_3 \cdot k_{-5}^* - EP_3^* \cdot k_{-4}^* - EP_3^* \cdot k_5^*, \\ E^* + ES^* + EP_2^* + EP_3^* = E_0. \end{cases} \quad (1)$$

Здесь  $E_0$  – общая концентрация фермента, индекс «\*» обозначает суммарные концентрации форм фермента, отличающихся степенью протонирования, и введение необходимого коэффициента в константы скоростей реакций.

Скорость расщедования субстрата описывается уравнением

$$\frac{dS}{dt} = ES^* k_{-1}^* - E^* \cdot S \cdot k_1^* \quad (2)$$

Подстановка в уравнение (2) стационарных концентраций форм фермента-лактазы дает зависимость в форме Моно

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-V_{\max}(S - K_1^d K_2^d K_3^d P_1 P_2)}{S + K_m + P_1(aS + bK_m + aK_1^d) + K_3^d K_m P_2 + dK_m P_3 + acP_1 P_2 + adK_1^d P_1 P_3 + abK_1^d P_1^2},$$

где максимальная скорость имеет вид  $V_{\max} = \frac{E_0 \cdot k_2^* \cdot k_3^*}{k_2^* + k_3^*}$ , кон-

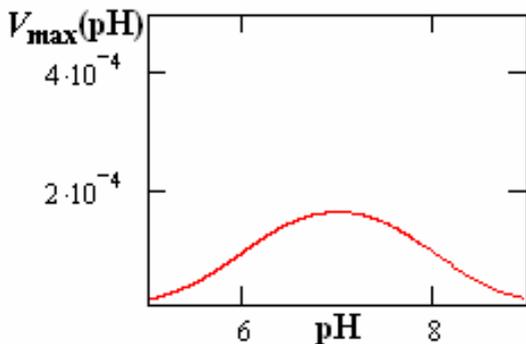
станта Михаэлиса –  $K_m = \frac{k_3^* \cdot (k_{-1}^* + k_2^*)}{k_1^* \cdot (k_2^* + k_3^*)}$ , остальные параметры –

$$a = \frac{k_{-2}^*}{k_2^* + k_3^*}; b = \frac{k_4^*}{k_{-4}^* + k_5^*}; c = \frac{k_{-3}^*}{k_1^*}; d = \frac{k_{-5}^*}{k_{-4}^* + k_5^*}; K_i^d = \frac{k_{-i}^*}{k_i^*}, i = \overline{1, 3}, .$$

Зависимость максимальной скорости протекания ферментативной реакции от уровня pH среды определяется как

$$V_{\max}([H^+]) = \frac{E_0 \cdot K_{2H}^{EP_2} \cdot K_{2H}^{ES} \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot [H^+]}{[H^+]^2 \cdot (K_{2H}^{ES} \cdot k_2 + K_{2H}^{EP_2} \cdot k_3) + K_{2H}^{EP_2} \cdot K_{2H}^{ES} \cdot [(H^+) \cdot (k_2 + k_3) + (k_2 \cdot K_{2H}^{EP_2} + k_3 \cdot K_{2H}^{ES})]}.$$

На рис. 2 представлена зависимость  $V_{\max}(pH)$  ( $pH = -\log([H^+])$ ). Кривая получена при следующих значениях параметров:



$$E_0 = 0.01M,$$

$$k_2 = 0.02c^{-1},$$

$$k_3 = 70c^{-1},$$

$$K_H^{ES} = 8 \cdot 10^{-9} M,$$

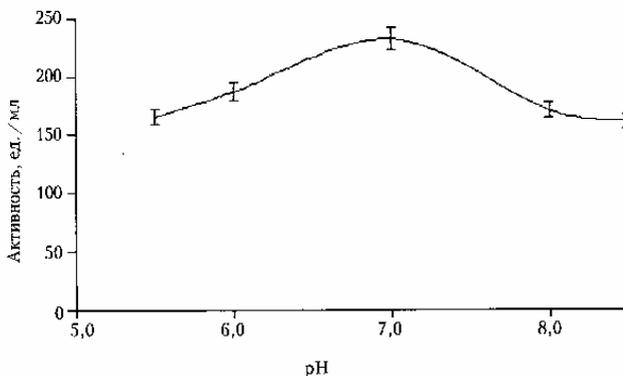
$$K_{2H}^{ES} = 10^{-6} M,$$

$$K_H^{EP_2} = 9 \cdot 10^{-6} M,$$

$$K_{2H}^{EP_2} = 15 \cdot 10^{-6} M.$$

**Рис. 2.** Модельная зависимость максимальной скорости ферментативного цикла лакказы от уровня pH среды

Максимальное значение скорости  $V_{\max}$  при этих значениях параметров достигается при  $\text{pH} = 6.988$ . Качественно, полученная «колоколообразная» форма зависимости совпадает с экспериментальными данными по активности лакказы (рис. 3).



**Рис. 3.** Экспериментально полученная зависимость активности лакказы от уровня pH среды[5]

Из модельных и экспериментальных данных видно, что кривая не имеет ярко выраженного максимума и значения максимальной скорости как при pH = 7, так и при pH = 6 – 8 отличаются несильно. Эти результаты демонстрируют возможность фермента работать в широком диапазоне pH, что подтверждается различными условиями существования *P. tigrinus* в природе [5].

**Заключение.** Построенная схема работы лакказы является первым шагом в исследовании функционирования ВФЛК гриба *P. tigrinus*. На основании экспериментальных данных необходимо провести количественные оценки параметров модели, сравнить модельные расчеты pH-зависимости максимальной скорости работы фермента с результатами опытов.

В дальнейшем планируется построить кинетические модели, описывающие функционирование остальных ключевых ферментов ферментов ВЛФК (Mn-пероксидазы, лакказы, пероксидазы). Затем полученные модели будут объединены в единую схему.

Работа выполнена при поддержке Программы Минобрнауки РФ "Развитие научного потенциала высшей школы (2006-2008 г)" № РНП.2.1.1.7708.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. d'Akunzo F. Carlo Galli, Patrizia Gentili and Federica Sergi., Mechanistic and steric issues in the oxidation of phenolic and non-phenolic compounds by laccase or laccase-mediator systems. The case of bi-functional substrates // New J.Chem. 2006. V. 30, P. 583-591.
2. K. G. Arzola, O. Polvillo, M. E. Arias, F. Perestelo, A. Carnicero, F. J. González-Vila, M. A. Falcón. Early attack and subsequent changes produced in an industrial lignin by a fungal laccase and a laccase-mediator system: an analytical approach // Appl Microbiol Biotechnol. 2006. V. 73. P. 141-150.
3. D. Quaratino, F. Federici, M. Petruccioli, M. Fenice, A. D'Annibale.

- Production, purification and partial characterisation of a novel laccase from the white-rot fungus *Panus tigrinus* CBS 577.79 Antonie van Leeuwenhoek, 2006, DOI 10.1007/s10482-006-9096-4.
4. Э. Корниш-Боуден. Основы ферментативной кинетики. М: Мир, 1979. — 282 с.
  5. Д.А. Кадималиев, В.В. Ревин, Н.А. Атыкян, В.В. Шутова Фундаментальные и прикладные основы биотехнологии экологически безопасных композиционных материалов / Под ред. проф. В.Д. Самуилова. Саранск. Изд-во Мордовского университета, 2005. — 192 с.

**MATHEMATICAL MODEL OF LACCASE FROM THE  
PANUS TIGRINUS LIGNOLITIC COMPLEX. PH-  
DEPENDENCE OF LACCASE FUNCTIONING**

**Fursova P. V., Nadezhina O. S., Lavrova A. I.,  
Kadimaliev D. A., Riznichenko G. Yu.**

*(Russia, Moscow)*

*Laccase is one of the key enzymes of the Panus tigrinus lignolitic complex. The scheme of laccase functioning is suggested. pH-dependence of the laccase activity is taken into account. The dependence of maximal rate of enzyme functioning on the medium proton concentration is received.*