

Obezbojavanje pigmenta helio genuine yellow light pomoću bukovače (*Pleurotus ostreatus*)

Ispitano je obezbojavanje pigmenta žute boje pomoću bukovače (*P. Ostreatus*). Bukovača je jestiva gljiva i odlično pomoćno lekovito sredstvo. Cilj rada je bio utvrditi obezbojenje pigmenta pomoću bukovače i odrediti ulogu izoenzima lakaze. Eksperiment je vršen na čvrstim i tečnoj podlozi. Kao čvrste podloge korišćene su PDY i MYP podloge, a kao tečna PDY podloga. Sve kulture su dopunjene sa 50 μM boje i sa vanilin šećerom, kvercetinom, a samo čvrste podloge sa taninskom kiselinom. Obezbojavanje na čvrstim podlogama je praćeno vizuelno, dok je na tečnim podlogama određivano spektrofotometrijski. Čvrste podloge su se obezbojile za 9 dana, a takođe je došlo i do obezbojavanja tečnih podloga. Imalo bi smisla uraditi eksperiment sa esejem za aril alkohol oksidazu i peroksidazu kako bi se uvidelo ponašanje boje delovanjem ovih enzima.

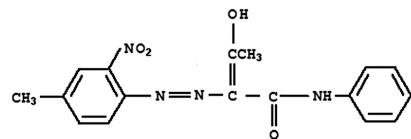
Uvod

Bukovača (*Pleurotus ostreatus*) je jestiva gljiva i odlično pomoćno lekovito sredstvo. Radi se o gljivi asimetričnog oblika, glatkog šesira sa ekscentrično ili lateralno postavljenom drškom. Bukovača sadrži sve esencijalne amniokiseline, sa izuzekom triptofana, zatim vitamine: B1, B2, B5, B6, B7, vitamin P i mnoge minerale. Proteini iz bukovače su po svom sastavu vrlo slični životinjskim. Pored toga sadrži i veliki procenat ugljenih hidrata i samo oko 4% masti (Pjević 1995). *P. ostreatus* proizvodi lakaze, mangan peroksidaze i veratril alkohol oksidaze. Nedavno je otkriven enzim ekstracelularna peroksidaza koju

proizvodi *Pleurotus ostreatus* i koja učestvuje u obezbojavanju (Vyas i Molitoris 1995). Ona pripada gljivama koje izazivaju belu trulež, vrstu degradacije drvnog materijala u kojoj učestvuju gljive koje degraduju lignin. Te gljive su prisutne u prirodi i napadaju mnoge biljke. One proizvode oksidativne enzime koji učestvuju u degradaciji lignina. Enzimi koji degraduju lignin su lakaze, lignin peroksidaze i mangan peroksidaze.

Lakaze su enzimi koji se nalaze u mnogim biljkama, gljivama i mikroorganizmima. Izvesno je da se lakaza luči u više formi što zavisi od vrste gljive i uslova životne sredine, ali da li te različite forme odgovaraju različitim ulogama enzima i dalje je nepoznato (Collins i Dobson 1997; Mansur *et al.* 1998; Wahleithner *et al.* 1996; Wood 1980). One vrste koje luči bukovača imaju ulogu u degradaciji lignina i zbog toga mogu biti uključene u široku kategoriju ligninaza.

Sintetičke boje se intenzivno koriste za bojenje tekstila i u druge industrijske primene. One imaju različite hemijske strukture. Procenjuje se da je ukupna svetska godišnja proizvodnja boja oko 800 hiljada tona (Zollinger 1987). Mnoga od ovih jedinjenja su veoma otporna na napad mikroba. Neke boje mogu biti opasne po život (Michaels i Lewis 1985).



Slika 1./Figure 1.

Helio genuine yellow light $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4$

Helio genuine yellow light je pigment žute boje koji se koristi u tekstilnoj industriji, kao i u slikarske svrhe. Ova boja se sastoji od pigmenta kadmijuma, visokog sjaja i neprozirnosti. U radu će biti

Marija Jeremić (1992), Beograd, Olge Alkalaj 3, učenica 3. razreda VIII beogradske gimnazije

MENTOR: Voin Petrović, Institut za nuklearne nauke Vinča

označena kao HGYL. To je primer organskog molekula koji bukovača može da degraduje.

Cilj ovog rada je da se ispita obezbojenje pigmenta pomoću bukovače.

Materijal i metode

Obezbojavanje je vršeno na dve vrste podloga (tečnim i čvrstim). Kao tečna podloga je korišćena PDY podloga, a kao čvrste su korišćene dve podloge (PDY, koja sadrži dekstrozu i ekstrakt kvasca, i MYP koja sadrži ekstrakt slada, pepton, ekstrakt kvasca i glukozu). Sve kulture su dopunjene sa 50 μM boje i sa vanilin šećerom, kvercetinom, a samo čvrste podloge sa taninskom kiselinom. Ove supstance su dodate da bi podstakle bukovaču da proizvodi enzime. *P. ostreatus* u prisustvu Helio genuine yellow light proizvodi lakaze, aril alkohol oksidaze i peroksidaze.

Grupe su bile postavljene na sledeći način:

Postojale su tri grupe i to: kontrola, A i B. One su se sastojale od supstanci koje su predviđene enzimskim esejom (boja + Na-acetatni pufer pH = 4.5), kojima su dodati vanilin šećer, kvercetin i micelijum bukovače.

K – boja + Na-acetatni pufer pH = 4.5 + PDY + boja

A – boja + Na-acetatni pufer pH = 4.5 + PDY + boja + vanilin šećer + bukovača

B – boja + Na-acetatni pufer pH = 4.5 + PDY + boja + kvercetin + bukovača

Medijum

Obezbojavanje na agar podlogama se vršilo na dva različita medijuma, PDY MYP. PDY sadrži 24 g/L dekstroze (Difco) i 5 g/L ekstrakta kvasca (Difco); MYP sadrži 100 g/L ekstrakta slada (Difco), 50 g/L Pepton (Difco), 50 g/L ekstrakta kvasca i 100 g/L glukoze (Difco). Solid kultura je dopunjena sa 50 μM helio genuine yellow light.

Sva obezbojavanja u eksperimentu su vršena u prisustvu 2 mM vanilin šećera, kvercetina i taninske kiseline. Obezbojavanja u tačnoj kulturi su izvedena korišćenjem PDY podloge dopunjene bojom (Palmieri *et al.* 2005).

Inokulum

Za obezbojavanje na solid medijumu, *P. ostreatus* micelijum je narastao na agar podlogama koris-

teći gore opisane medijume dopunjene sa 50 μM helio genuine yellow light i 2 mM vanilin šećera, kvercetina i taninske kiseline, i inkubirano je na 28°C do odgovarajućeg rasta micelijuma.

Inokulum za tačne kulture je pripremljen preinokulisanjem 300 mL smeše PDY sa micelijumom na temperaturi od 28°C. 25 mL šest dana stare kulture prenete su u boce od 1 L sa 225 mL PDY smeše, dopunjeno bojom i kvercetinom ili vanilin šećerom. Kulture se inkubiraju u mraku na 28°C. Uzorci se koriste za utvrđivanje aktivnosti enzima i obezbojavanja (Palmieri *et al.* 2005).

Promena HGYL od *P. ostreatus*

Obezbojavanje medijuma se prati vizuelno, posmatrajući nestanak boje sa ploča. Obezbojavanje u tačnim kulturama se meri spektrofotometrijski u talasnim dužinama u opsegu 200-800 nm i merenjem apsorbance na 410 nm, što odgovara boji vidljive apsorbance maksimalne talasne dužine. Eksperiment je ponovljen tri puta.

Enzimski esej

Radena su dva enzimska esej.

Prvi esej. Aktivnost lakaze je merena u nultom minutu i dvadestom minutu. Aktivnost se meri na 25°C koristeći ABTS. Test smeša sadrži 2 mM ABTS u 0.1M natrijum citratnom puferu, pH 3.0. Aktivnost je merena na apsorbanci od 420 nm ($36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). ABTS (2,2-azo-bis (3-etilbenzotiazol-6 sulfonska kiselina)) je jedinjenje koje se koristi za posmatranje kinetičke reakcije određenih enzima.

Drugi esej. Aktivnost lakaze, koja je merena koristeći boju kao supstrat, se meri na 25°C. Proba sadrži 150 μM 50 mL HGYL u 20 mM Na-acetatnom puferu, pH 4.5. Aktivnost je merena na apsorbanci od 410 nm ($9000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Palmieri *et al.* 2005).

Rezultati i diskusija

Obezbojavanje na čvrstim podlogama

Na čvrstim PDY podlogama je došlo do obezbojenja. Vreme koje je potrebno bukovači da obezboji tekstilnu boju, prema prethodnim radovima, je 8 dana (Palmieri *et al.* 2005), s tim što je korišćena RBBR (Remazol Brilliant Blue R). Proces obezbo-

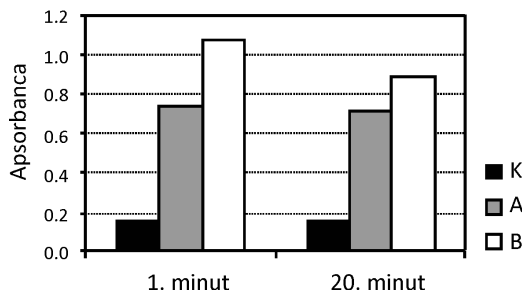
javanja HGYL je trajao 9 dana, tj. tada je došlo do konačnog obezbojenja, dok su se prve naznake obezbojenja javile petog dana od dana postavljanja eksperimenta. Drugog dana od postavljanja eksperimenta je došlo do naglog rasta micelijuma, tako da je micelijum najpre narastao na podlozi sa kvercetinom, zatim na podlozi sa vanilin šećerom, potom na podlozi sa bojom i na kraju na podlozi sa taninskom kiselinom. Rast micelijuma je počeo da se ujednačava na svim podlogama petog dana, kada su se javile i prve naznake obezbojenja.

Iz nepoznatih razloga na MYP podlogama nije došlo do razvitka micelijuma.

Obezbojavanje na tečnoj podlozi

Na grafiku (slika 2) se uočava se da nakon određenog vremenskog perioda, u ovom slučaju 20 minuta, dolazi do smanjenja apsorbance, što znači da enzimi razgrađuju boju. Najveći pad apsorbance nakon 20 minuta uočava se kod grupe sa kvercetinom, zatim kod grupe sa vanilin šećerom i na kraju kod kontrolne grupe. Nameće se pretpostavka da su kvercetin i vanilin šećer supstance koje dodatno aktiviraju enzime bukovače, tako da oni većom brzinom razgrađuju boju na podlogama sa kvercetinom i vanilin šećerom nego u kontrolnoj grupi.

Esej sa ABTS-om je doveo do povećanja apsorbance kod grupe A. Pretpostavlja se da je došlo do reakcije između ABTS-a i fermentacione smeše. To je sporedna reakcija sa peroksidazama koja dovodi do obojenja ABTS-a. U ostalim grupama dolazi do smanjenja apsorbance, što znači da bukovača ima ulogu u obezbojavanju. Najpre se obezbojila grupa sa kvercetinom, pa onda grupa sa vanilin šećerom.



Slika 2. Apsorbance merene na 1. i 20. minutu kod kontrolne i tretiranih grupa

Figure 2. Absorbance, measured on the 1. and 20. minutes in the control (K) and treated groups

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da je došlo do obezbojenja na čvrstim PDY podlogama, kao i u tečnoj PDY podlozi. Dokazano je da je bukovača sposobna da obezboji HGYL, tj. enzimi koje proizvodi bukovača su sposobni da je obezboje. Imalo bi smisla uraditi eksperiment sa esejem za aril alkohol oksidazu i peroksidazu kako bi se uvidelo ponašanje boje delovanjem ovih enzima. Saznanje da bukovača ima sposobnost obezbojavanja organskih jedinjenja je veoma značajno, jer se može praktično iskoristiti u procesu bioremedijacije tj. može se koristiti za degradaciju toksičnih supstanci do manje toksičnih ili netoksičnih supstanci.

Literatura

Collins P. J., Dobson A. D. W. 1997. Regulation of Laccase gene expression in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 3444.

Mansur M., Suarez T., Gonzalez A. E. 1998. Differential gene expression in the laccase gene family from basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 771.

Michaels G. B., Lewis D. L. 1985. Sorption and toxicity of azo and triphenyl methane dyes to aquatic microbial population. *Environ. Toxicol. Chem.*, **4**: 45.

Palmieri G., Cennamo G., Sannia G. 2005. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. Elsevier. *Enzyme and Microbial Technology*, **36**: 17.

Pjević M. 1995. *Lekovite gljive*. Beograd: Ekološka organizacija za istraživanje i zaštitu gljiva

Vyas B. R. M., Molitoris H. P. 1995. Involvement of an extracellular H_2O_2 -dependent lignolytic activity of the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolourisation of Remazol Brilliant Blue R. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61** (11): 3919.

Wahleithner J. A., Xu F., Brown K. M., Brown S. H., Golightly E. J., Halkier T., et al. 1996. The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Curr. Genet.*, **29**: 395.

Wood D. A. 1980. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.*, **117**: 327.

Zollinger H. 1987. *Colour chemistry-syntheses, properties and application of organic dyes and pigments*. New York: VCH Publishers

Marija Jeremić

Decolorization of Helio Genuine Yellow Light with *P. Ostreatus*

We examined the bleaching of a yellow pigment with *P. ostreatus*. *P. Ostreatus* is edible and a great accessory remedy. The aim was to determine the role of izoenzymes laccase on the bleaching of the pigment.

The experiment was carried out on a solid and a liquid medium. As solid supports PDY and MYP mediums were used, and the liquid surface was PDY. All cultures were supplemented with 50 μ M color with vanilla sugar, quercetin, and only a solid base with tannic acid.

Bleaching on solid substrates was followed visually, while the liquid media was determined by spectrophotometry. Solid surfaces were bleached in 9 days, as well as the liquid media. It would make sense to do an experiment with assays for the aryl alcohol oxidase and peroxidase in order to observe the color reaction to these enzymes. The realization that *P. ostreatus* has the ability of bleaching organic molecules is very important, because it can be put to practical use in the bioremediation process, and it can be used for the degradation of toxic substances to less toxic or nontoxic substances. 