

УДК 579.222:631.4:502

ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ АСКОМИЦЕТОВ ТРАНСФОРМИРОВАТЬ ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТ

© 2022 г. Н. Н. Позднякова¹, *, А. М. Буров¹,
Е. А. Антонов², А. В. Александрова², О. В. Турковская¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Саратовский научный центр Российской академии наук”, Саратов, 410049 Россия

²Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*e-mail: pozdneyakova_n@ibppm.ru

Поступила в редакцию 07.07.2022 г.

После доработки 07.08.2022 г.

Принята к публикации 28.08.2022 г.

В работе показано, что почвообитающие аскомицеты, относящиеся к разным эколого-физиологическим группам (*Lecanicillium aphanocladii*, *Talaromyces sayulitensis*, *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum*), могут использовать полиэтилентерефталат (ПЭТ) в качестве единственного источника углерода и энергии. Утилизация ПЭТ исследуемыми грибами, за исключением *L. aphanocladii*, сопровождалась образованием эмульгирующих веществ. У всех грибов выявлена активность кутиназы — ключевого фермента процесса деполимеризации ПЭТ, а также ряда оксидоредуктаз, по-видимому, катализирующих окисление образующихся продуктов: пероксидаз — у *F. oxysporum* и *T. harzianum*, пероксидаз и оксидаз — у *L. aphanocladii* и *T. sayulitensis*. Полученные данные могут быть использованы для разработки экологических биотехнологий и вносят вклад в понимание процессов деградации/трансформации различных видов пластика в природных экосистемах.

Ключевые слова: полиэтилентерефталат, аскомицеты, кутиназа, пероксидаза, оксидаза, эмульгирующие вещества

DOI: 10.56304/S023427582205012X

Различные виды пластика занимают особое место в спектре антропогенных химических веществ, представляющих опасность для окружающей среды. Большинство используемых сегодня видов пластика поступили в массовое производство примерно в середине 20 века. Промышленное производство полистирола и поливинилхлорида началось около 1930 г, полиамидов, полиуретана и полиэтилена — в конце 1930 г, полиэтилентерефталата и полипропилена — в 1940 и 1950 годов. С тех пор производство пластмасс постоянно растет [1–4]. В целом синтетические полимеры производятся во всем мире в масштабе от 350 до 400 миллионов тонн ежегодно [<https://www.plasticsinsight.com/global-pet-resin-production-capacity>, <https://www.plasticsinsight.com/resin-intelligence/resin-prices/polyamide/>, <https://www.plasticsinsight.com/world-plastics-production/>]. Основные полимеры, которые производятся и имеют значение для экономики: полиуретан, полиэтилен, по-

лиамид (нейлон-6), полиэтилентерефталат, полистирол, поливинилхлорид и полипропилен [2]. Так называемые “биопластики”, являющиеся производными природных полимеров, играют довольно незначительную роль в объемах производства. Около 60% из них не поддаются биологическому разложению [3–5].

Выполнив свое предназначение, пластиковый предмет пойдет по одному из трех заранее определенных путей: (1) утилизация — повторное использование материала для производства нового пластика — самый экологически чистый путь; (2) сжигание — восстановление энергетической ценности; (3) захоронение на свалках. К сожалению, пластиковые материалы теряются на всех этапах и попадают в окружающую среду. Там эти материалы подвергаются комбинированному действию нескольких факторов: света, воды, механического воздействия и, возможно, биоты, что приводит к их фрагментации на более мелкие части и в конечном итоге — к так называемым “микропластикам” — частицам размером менее 5 мм [6]. В связи с серьезной опасностью, которую пластики пред-

Список сокращений: ПЭТ — полиэтилентерефталат; АБТС — 2,2-азино-ди-3-этилбензотиазолин-6-сульфонат; ПАУ — полициклические ароматические углеводороды.

ставляют для окружающей среды, и все увеличивается их производством и использованием, в последнее время широко обсуждается возможность биологического рециклинга пластиковых отходов [4].

С точки зрения биodeградации, все пластики делятся на гидролизуемые и негидролизуемые [1]. Природные полимеры, такие как целлюлоза, хитин или белки, обычно деполимеризуются путем гидролитического расщепления связей, соединяющих мономеры. Следовательно, можно ожидать, что искусственные полимеры с гидролизуемой основной структурой будут легко биодеградироваться по этому же пути. Для многих биопластиков действительно так и происходит, что и приводит к их полной биодеградации в окружающей среде в сроки от нескольких дней до нескольких месяцев [7]. Однако есть некоторые исключения, которые, к сожалению, являются наиболее распространенными среди теоретически гидролизуемых пластиков: полиамиды (в первую очередь нейлон), полиэтилентерефталат и полиуретаны [1, 2].

Полиэтилентерефталат (ПЭТ) – ароматический полиэфир терефталевой кислоты с этиленгликолем. В основном применяется для производства синтетических волокон, но более известно его использование для получения пластиковых бутылок, что составляет значительную часть годового производства ПЭТ. Долгое время ПЭТ считался инертным к биодеградации [8], что приписывали высокой температуре плавления ароматических полиэфиров, приводящей к низкой подвижности полимерных цепей [9]. Только в 2005 г. было показано, что гидролаза (кутиназа) из термофильного актиномицета *Thermobifida fusca* вызывала снижение массы низко кристаллических пленок ПЭТ примерно на 50% в течение 3 недель при 55°C [10]. Ронквист с соавт. [11] показали, что кутиназа из гриба мягкой гнили *Humicola insolens* разрушала 97% низкокристаллических пленок ПЭТ в течение 96 ч при 70°C. Полученные результаты иллюстрируют важность температуры деградации, которая близка температуре стеклования субстрата (75°C в обеих публикациях). Эти данные также указывают на большие проблемы биодеградации ПЭТ в окружающей среде, где обычная температура намного ниже. С тех пор опубликованные данные в основном касались потенциального промышленного применения кутиназы, например, в переработке или модификации волокон ПЭТ [3].

Способность деградировать ПЭТ и продуцировать кутиназу позже была обнаружена у отдельных представителей аскомицетов: *Aspergillus oryzae* [12], *Tielavia terrestris* [13], *Microsphaeropsis arundinis* [14], *Fusarium falciforme* [15], *F. oxysporum* [16, 17], *F. solani* [3, 16, 18]. Показано, что грибная кутиназа, так же, как и фермент из актиномицета

T. fusca, гидролизует волокна ПЭТ, увеличивая их гидрофобность [16, 18], в качестве основного продукта реакции выявлена терефталевая кислота [16]. Определена кристаллическая структура кутиназы; фермент проявлял максимальную активность при pH 8.0 и 40°C с *p*-нитрофенилбутиратом в качестве тестового субстрата. Показана способность этого фермента гидролизовать субстраты, моделирующие структуру ПЭТ, в том числе бис-(2-гидроксиэтил)терефталат [17, 19].

Таким образом, исследования грибной деградации ПЭТ в основном посвящены характеристике кутиназы и перспективе ее биотехнологического использования. По нашему мнению, поиск новых грибов-деструкторов пластиков, включая ПЭТ, а также изучение ключевых ферментов, участвующих в их деградации/трансформации, является актуальным и практически важным.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использованы штаммы аскомицетов из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (WFCC975, WDCM1021): *Lecanicillium aphanocladii* Zare & W. Gams (IBPPM 542) и *Fusarium oxysporum* (IBPPM 543), выделенные из загрязненных нефтью образцов [20], *Trichoderma harzianum*¹, полученный из Института проблем экологии и эволюции РАН от д.б.н., профессора В.А. Тереховой, а также *Talaromyces sayulitensis* (IBPPM 664) выделенный из ризосферы мискантуса, выращенного в условиях загрязнения цинком. *T. sayulitensis* был идентифицирован с использованием полифазного подхода [21], сочетающего характеристику культуральных и микроскопических признаков колоний, а также секвенирование ITS региона и участка гена бета-тубулина (BenA).

Культуры грибов поддерживали на скошенном агаре с богатой средой для базидиомицетов [22] в нашей модификации, следующего состава (г/л): NH₄NO₃ – 0.724, KH₂PO₄ – 1.0, MgSO₄·7H₂O – 1.0, KCl – 0.5, дрожжевой экстракт – 0.5, FeSO₄·7H₂O – 0.01, ZnSO₄·7H₂O – 0.0028, CaCl₂·2H₂O – 0.033, глюкоза – 10.0, пептон – 10.0. pH среды составлял 6.0. Для получения инокулята грибы культивировали в колбах объемом 250 мл со 100 мл этой же среды без добавления агар-агара. Солевую основу этой среды (исключали глюкозу, пептон, дрожжевой экстракт) использовали для изучения деструктивной активности грибов по отношению ПЭТ.

Пластинки ПЭТ (фрагменты 1 × 1 см получали из пластиковых бутылок) стерилизовали этиловым спиртом в течение 1 часа, остатки спирта удаляли стерильной фильтровальной бумагой. ПЭТ (500 мг)

¹ Авторы благодарят д.б.н., профессора В.А. Терехову за предоставленный штамм.

помещали в стерильную солевую среду и засеивали 5 мл грибного инокулята. В контрольные варианты вносили 200 мкл спирта (биологический контроль, инокулированный грибными культурами) или 500 мг ПЭТ (химический контроль, без инокуляции). Экспериментальные и контрольные колбы культивировали при 24°C и 130 об/мин в течение 30 сут. Через определенные интервалы времени из колб отбирали аликвоту (3 мл) для определения мутности и тестирования активности ферментов как описано ниже. В конце эксперимента мицелий отфильтровывали и высушивали на фильтрах. Пластинки ПЭТ отмывали дистиллированной водой и высушивали. Убыль ПЭТ и прирост мицелия оценивали весовым методом.

Микроскопию образцов ПЭТ проводили в Центре коллективного пользования (ЦКП) научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии “Симбиоз” ИБФРМ РАН на микроскопе LEICA DFC 290 (Leica Microsystems, Германия) при увеличении 120.

Для выявления способности грибов к продукции биоПАВ в процессе деградации ПЭТ, эмульгирующую активность культуральной жидкости тестировали методом Купера [23]. Культуральную жидкость смешивали с керосином в соотношении 2 : 3, встряхивали в течение 20 мин в мерной пробирке и оставляли на 48 ч при комнатной температуре для разделения. Эмульгирующую активность (E_{48}) вычисляли как соотношение объема эмульсии к общему объему жидкости и выражали в процентах.

При исследовании продукции ферментов активность оксидаз определяли по скорости образования продукта окисления АБТС при 436 нм [24]. Активность пероксидаз определяли также по АБТС в присутствии 0.2 мМ H_2O_2 и рассчитывали по разнице между активностью без H_2O_2 и активностью в ее присутствии. Активность кутиназы – по образованию *p*-нитрофенола при гидролизе *p*-нитрофенилбутирата при 410 нм [25]. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль продукта окисления в минуту, и выражали в условных единицах – Ед/мл ферментного препарата.

Все варианты описанных экспериментов и анализов имели не менее чем трехкратную повторяемость. Каждый эксперимент повторяли не менее трех раз. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью Microsoft Excel 2003 и Origin 7.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Утилизация ПЭТ аскомицетами

В наших экспериментах были использованы аскомицеты, принадлежащие к разным эколого-физиологическим группам: фитопатогенный *Fusarium oxysporum*, энтомопатогенный *Lecanicillium aphanocladii*, ризосферный *Talaromyces sayulitensis* и почвообитающий *Trichoderma harzianum*. Среди исследуемых нами грибов, ранее способность утилизировать ПЭТ была описана только у представителей рода *Fusarium* [3, 15–18]. Для грибов рода *Trichoderma* деградативная активность по отношению к некоторым поллютантам, в том числе полиэтилену описана и хорошо известна [26]. Для грибов рода *Talaromyces* таких сведений немного, в основном исследования посвящены деградации ПАУ, нефти [27] или лигноцеллюлозных субстратов [28]. Также недостаточно изучены деградативные свойства представителей рода *Lecanicillium*. Показана способность отдельных видов этого рода метаболизировать 2,4-дихлорфенол, 2,4-дихлорфеноксисульфоновую кислоту [29] и ПАУ [30, 31].

Все исследованные нами грибы могли утилизировать ПЭТ, используя его в качестве единственного источника углерода и энергии. Об этом свидетельствует рост грибов, как в погруженной культуре, так и на пластинах ПЭТ (рис. 1). В контрольных вариантах (без ПЭТ) роста гриба не наблюдалось. Согласно результатам микроскопических исследований мицелий растет не только на поверхности пластинок (рис. 1а, 1б, 1с, 1д), но и проникает в них, о чем свидетельствуют морфологические изменения пластика, отсутствующие в абиотическом контроле. Подобные изменения были обнаружены Sowmya с соавт. [26] которые показали, что *T. harzianum*, используя полиэтилен как единственный источник углерода способен образовывать отверстия, разрушающие его структуру.

Увеличение оптической плотности (A_{600}) среды культивирования также свидетельствует о росте мицелия и деполимеризации ПЭТ [18]. В наших экспериментах показано увеличение A_{600} для всех исследованных грибов (рис. 2). Наиболее активно росли *F. oxysporum* и *T. sayulitensis*, максимум A_{600} составлял около 0.6 через 26 сут культивирования. Для *T. harzianum* отмечено почти линейное увеличение оптической плотности среды культивирования до 0.49 в конце эксперимента. Оптическая плотность среды культивирования *L. aphanocladii* достигала только 0.4 на 8 сут. При дальнейшем культивировании наблюдается незначительное снижение A_{600} , что может быть результатом лизиса мицелия этого гриба. Изгибы на кривых, описывающих изменение оптической плотности, могут быть также связаны с ли-

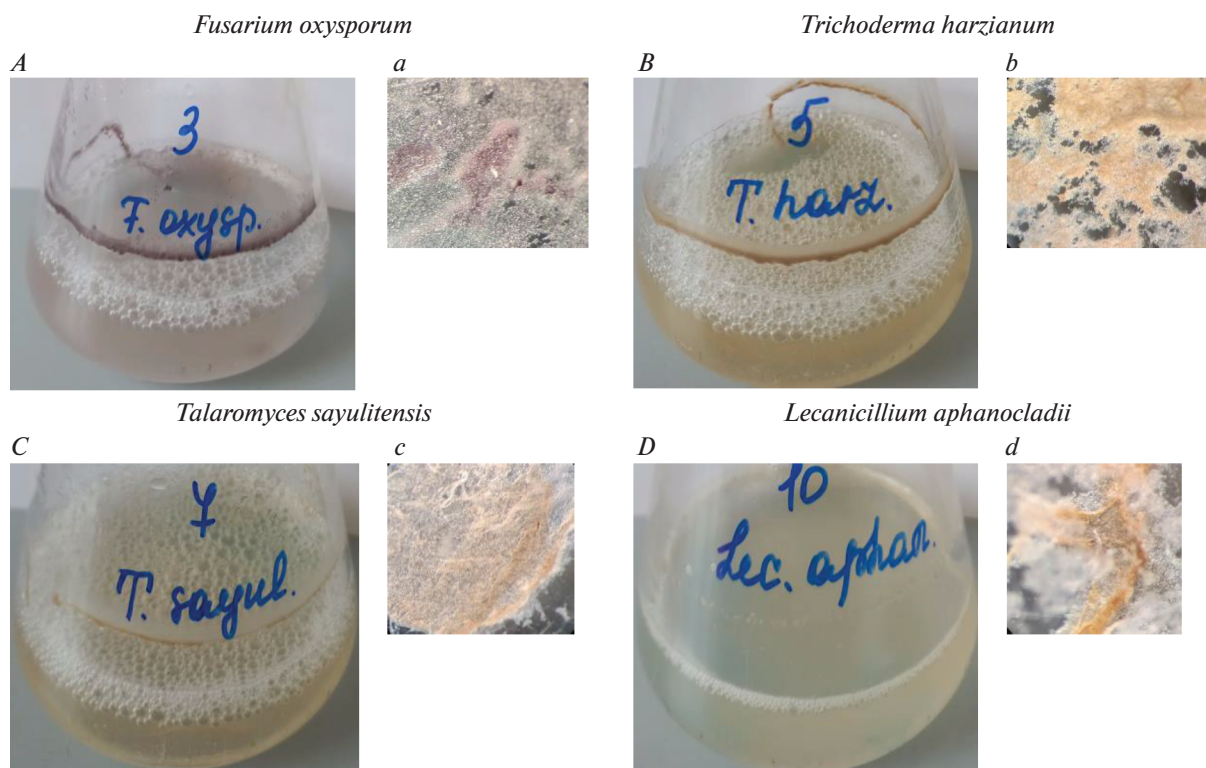


Рис. 1. Рост мицелия грибов в толще среды (A, B, C, D) и на поверхности пластинок ПЭТ (a, b, c, d) (LEICA DFC 290, увеличение 120).

Fig. 1. The growth of mycelium of fungi in the medium (A, B, C, D) and on the surface of PET plates (a, b, c, d) (LEICA DFC 290, magnification 120).

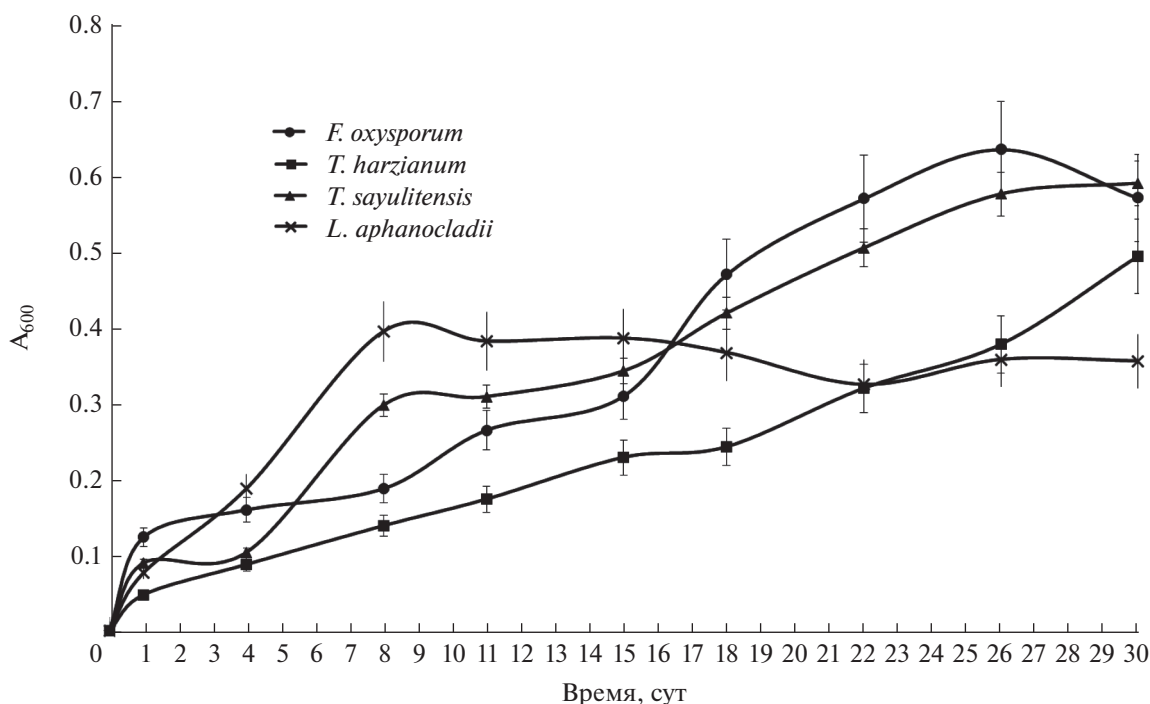


Рис. 2. Динамика увеличения оптической плотности среды культивирования в процессе утилизации ПЭТ *F. oxysporum* (●), *T. harzianum* (■), *T. sayulitensis* (▲), *L. aphanocladii* (×).

Fig. 2. The time course of increase of absorption of the cultivation medium during of utilization of PET by *F. oxysporum* (●), *T. harzianum* (■), *T. sayulitensis* (▲), *L. aphanocladii* (×).

Таблица 1. Деградация ПЭТ аскомицетами
Table 1. The degradation of PET by ascomycetes

Гриб	A ₆₀₀ (в максимуме)	Сухой вес мицелия, мг	Убыль ПЭТ, %	Эмульгирующая активность, E ₄₈
<i>F. oxysporum</i>	0.63 ± 0.08	212.0 ± 23.0	22.0 ± 2.2	1.5 ± 0.5
<i>T. harzianum</i>	0.49 ± 0.05	148.3 ± 15.1	17.2 ± 3.8	2.0 ± 0.5
<i>T. sayulitensis</i>	0.59 ± 0.1	96.7 ± 18.0	10.0 ± 3.3	2.0 ± 0.5
<i>L. aphanocladii</i>	0.39 ± 0.09	121.8 ± 20.0	11.6 ± 2.9	0 ± 0

зисом культуры и с образованием/ утилизацией продуктов деградации ПЭТ.

В конце эксперимента сухой вес пластинок ПЭТ снижался на 10–22% за 30 сут, при этом отмечено увеличение сухого веса мицелия 97–212 мг для разных видов грибов. (табл. 1).

Согласно данным, представленным на рис. 1А, 1В, 1С, утилизация ПЭТ *F. oxysporum*, *T. harzianum* и *T. sayulitensis* сопровождалась образованием пены, что может свидетельствовать о продукции биосурфактантов. Продукция биосурфактантов грибами описана в ряде исследований [32, 33]. Наиболее широко подобные продуценты представлены среди аскомицетов, включая грибы, относящиеся к родам *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Aureobasidium*, *Xylaria* [34].

Одним из первых этапов оценки продукции биосурфактанов является определение эмульгирующей активности среды культивирования [32, 33]. Эта эмульгирующая активность (E₄₈) была нами оценена после роста грибов с использованием ПЭТ в качестве единственного источника углерода. В конце эксперимента E₄₈ для *F. oxysporum*, *T. harzianum*) и *T. sayulitensis* составляла 1.5–2%, что может свидетельствовать о продукции этими грибами биосурфактантов. Образования пены в процессе культивирования *L. aphanocladii* обнаружено не было, E₄₈ равнялась нулю (табл. 1).

Известно, что биосурфактанты, продуцируемые аскомицетами, имеют разную структуру. Так, например, *Fusarium* sp. BS-8 продуцировал липопептид [35], *F. fujikuroi* — гликолипид [32], *F. proliferatum* — енамин [34], *Trichoderma resei* — гидрофобины [33]. Показано, что гидрофобины *Trichoderma* spp. стимулировали катализируемый кутиназой гидролиз ПЭТ [36]. По-видимому, выявленные нами биосурфактанты могут способствовать увеличению доступности полимерной молекулы ПЭТ для деполимеризующих ферментов. Это предположение будет предметом дальнейших исследований.

2. Продукция внеклеточных ферментов в процессе утилизации ПЭТ грибами

Утилизация ПЭТ исследуемыми грибами сопровождалась продукцией двух ферментов: кутиназы — первого фермента, отвечающего за деполимеризацию, и внеклеточной пероксидазы.

На рис. 3 представлена динамика продукции кутиназы, которая начиналась со 2–3 сут культивирования для всех грибов и достигала максимума на 18–22 сут. Наиболее активными продуцентами этого фермента были *F. oxysporum* и *L. aphanocladii* (активность 119 и 98 Ед/мл соответственно). Активность кутиназ *T. sayulitensis* и *T. harzianum* достигала 37 и 34 Ед/мл соответственно, при этом ее максимум у *T. harzianum* был уже на 8 сут, далее активность фермента снижалась (рис. 3).

Участие гидролаз — кутиназ в гидролизе ПЭТ продемонстрирована рядом авторов [10, 11, 37, 38]. Естественный субстрат этих ферментов кутин — основной компонент кутикулы растений — является гидрофобным алифатическим полиэфиром ω-гидроксикислот [39]. Поэтому неудивительно, что кутиназы способны деполимеризовать гидрофобный ПЭТ, по крайней мере, до определенной степени.

Гидролитическая биодеградация ПЭТ имеет некоторые параллели с деполимеризацией природных полимеров, таких как целлюлоза. Было показано, что кристаллическая структура полимера является решающим фактором для биодеградации, так как высоко кристаллические области устойчивы к гидролизу, в то время как более аморфные более доступны как в ПЭТ, так и в целлюлозе [9, 40]. Этот эффект был приписан большей подвижности аморфных полимерных цепей в водной среде, где происходит ферментативный катализ. Кроме того, ферменты, разрушающие целлюлозу, ингибируются продуктами ее деполимеризации, такими как целлобиоза и глюкоза [41]. Точно так же ингибирование продукции кутиназы глюкозой или другим доступным источником углерода описано рядом авторов [16, 18]. Кроме

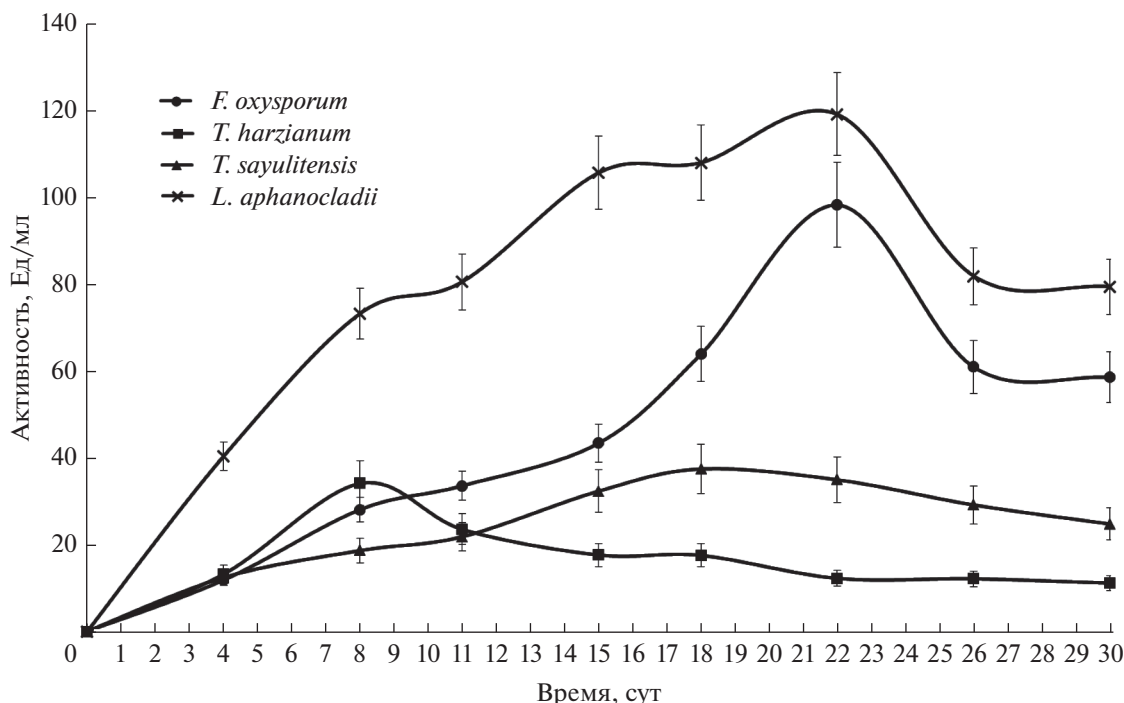


Рис. 3. Динамика продукции кутиназы в процессе утилизации ПЭТ *F. oxysporum* (●), *T. harzianum* (■), *T. sayulitensis* (▲), *L. aphanocladii* (×).
Fig. 3. The time course of production of cutinase during PET utilization by *F. oxysporum* (●), *T. harzianum* (■), *T. sayulitensis* (▲), *L. aphanocladii* (×).

того, гидролиз ПЭТ кутиназой *T. fusca* ингибируется промежуточными продуктами гидролиза ПЭТ: моно- и бис- 2-гидроксиэтилтерефталатами [42].

В наших экспериментах также было обнаружено, что при внесении в среду культивирования дополнительного источника углерода (глюкозы) не было продукции кутиназы и, соответственно, утилизации ПЭТ всеми исследованными грибами. По-видимому, отсутствие этого фермента является основной причиной отсутствия утилизации ПЭТ в данных условиях.

Производство кутиназы представителями рода *Fusarium* описано рядом авторов [15–18]. У трех других исследованных нами аскомицетов *T. harzianum*, *T. sayulitensis*, *L. aphanocladii* кутиназа обнаружена впервые.

Вторым ферментом, выявленным нами в процессе утилизации ПЭТ, была пероксидаза. Дegradацию поллютантов аскомицетами часто связывают с продукцией ими внеклеточных оксидаз (лакказ) и пероксидаз (лигнин пероксидаза, Mn-пероксидаза). При этом основная часть исследований, описанных в литературе, посвящена лакказам. Сведений о продукции аскомицетами лигнинолитических пероксидаз немного, еще меньше информации об участии этих ферментов в дeгpа-

дации природных субстратов и поллютантов. Так, например, продукция лигнин пероксидазы и Mn-пероксидазы обнаружена у *Coniochaerta ligniaria* при росте на лигноцеллюлозных субстратах [43]. *F. solani* продуцировал лигнин пероксидазу, Mn-пероксидазу и лакказу в ответ на окислительный стресс [44]. У другого штамма этого же гриба при культивировании в условиях лимита по углероду выявлялся невысокий уровень Mn-пероксидазы, тогда как два других лигнинолитических фермента отсутствовали [45]. При культивировании еще двух штаммов *Fusarium* на растительных остатках выявлено наличие Mn-пероксидазы [46].

Производство внеклеточных пероксидаз в ответ на присутствие в среде культивирования поллютантов была показана нами ранее для *F. oxysporum* и *L. aphanocladii* [31].

Сведений о продукции грибами внеклеточных пероксидаз в процессе дeгpадации/трансформации ПЭТ в настоящее время нет. Образование Mn-пероксидазы и оксидазы (предположительно лакказы) *T. harzianum* в процессе дeгpадации полиэтилена описано Совмией с соавт. [26]. При этом инкубация исходного полимера с частично очищенными ферментами приводила к его частич-

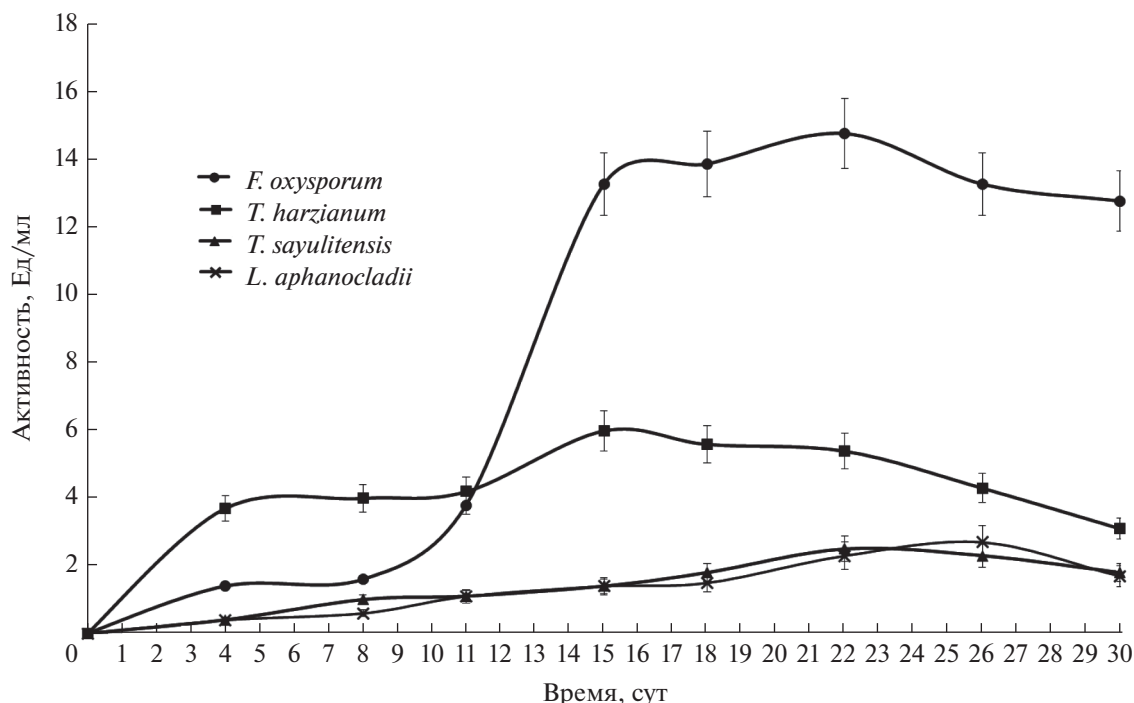


Рис. 4. Динамика продукции пероксидазы в процессе утилизации ПЭТ *F. oxysporum* (●), *T. harzianum* (■), *T. sayulitensis* (▲), *L. aphanocladii* (×).

Fig. 4. The time course of production of peroxidase during PET utilization by *F. oxysporum* (●), *T. harzianum* (■), *T. sayulitensis* (▲), *L. aphanocladii* (×).

ной деградации, что подтверждает их участие в этом процессе [26].

В наших экспериментах установлено, что все исследованные аскомицеты продуцируют пероксидазу в процессе утилизации ПЭТ. Наибольшая активность этого фермента выявлена у *F. oxysporum* (14.8 Ед/мл) и *T. harzianum* (6 Ед/мл). У двух других грибов активность пероксидаз не превышала 2 Ед/мл (рис. 4). Как следует из представленных на рис. 4 данных основная продукция пероксидаз начинается с 8–10 сут культивирования, что позволяет предположить участие этих ферментов в утилизации образующихся метаболитов.

В данном эксперименте у грибов *L. aphanocladii* и *T. sayulitensis* выявлены, кроме того, следовые количества внеклеточных оксидаз (по реакции окисления АБТС).

Таким образом, у аскомицетов, принадлежащих к разным эколого-физиологическим группам, нами была обнаружена способность утилизировать ПЭТ в качестве единственного источника углерода и энергии, причем эта способность для грибов *L. aphanocladii*, *T. harzianum* и *T. sayulitensis* продемонстрирована нами впервые. Следует отметить, что утилизация проходила при температуре 26–28°C, что отличает аскомицеты

от бактериальной деградации этого субстрата. Способность утилизировать ПЭТ является следствием продукции аскомицетами кутиназы – фермента, деградирующего подобные полимеры. Второй фермент – пероксидаза необходима грибам для утилизации образующихся ароматических моно- и олигомеров. Продукция пероксидазы в процессе деградации ПЭТ аскомицетами также показана нами впервые. Выявленное нами образование биосурфактантов, в процессе утилизации ПЭТ грибами *F. oxysporum*, *T. harzianum*) и *T. sayulitensis* возможно способствует увеличению доступности полимерной молекулы для деполимеризующих ферментов.

Полученные данные вносят вклад в понимание процессов самоочищения природных экосистем от пластика и могут быть использованы для разработки экологических биотехнологий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках темы госзадания №ГР 121031700141-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kruger M., Harms H., Schlosser D. Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plas-

- tics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 99, 8857–8874. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6879-4>
2. *Danso D., Chow J., Streit W.* Plastics: Environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2019, 85, e01095-19. <https://doi.org/10.1128/aem.01095-19>
 3. *Qi X., Yan W., Cao Z., Ding M., Yuan Y.* Current advances in the biodegradation and bioconversion of polyethylene terephthalate. *Microorganisms*, 2022, 10, 39. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010039>
 4. *Soong Y.-H.V., Sobkowicz M.J., Xie D.* Recent advances in biological recycling of polyethylene terephthalate (PET) plastic wastes. *Bioengineering*, 2022, 9, 98. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9030098>
 5. *Vert M., Doi Y., Hellwich K.H., Hess M., Hodge P., Kubisa P., Rinaudo M., Schue F.* Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.*, 2012, 84, 377–410. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>
 6. *Arthur C., Baker J., Bamford H.* Proc. International Research Workshop on the occurrence, effects and fate of microplastic marine debris, 9–11 September 2008. NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R30, US NOAA Marine Debris Division, Silver Spring, 2009.
 7. *Tokiwa Y., Calabia B., Ugwu C., Aiba S.* Biodegradability of plastics. *Int. J. Mol. Sci.*, 2009, 10, 3722–3742. <https://doi.org/10.3390/ijms10093722>
 8. *Muller R., Kleeberg I., Deckwer W.* Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *J. Biotechnol.*, 2001, 86, 87–95. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00407-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00407-7)
 9. *Marten E., Muller R., Deckwer W.* Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic-aromatic copolyesters. *Polym. Degrad. Stab.*, 2005, 88, 371–381. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2004.12.001>
 10. *Muller R., Schrader H., Profe J., Dresler K., Deckwer W.* Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): rapid hydrolyse using a hydrolase from *T.fusca*. *Macromol. Rapid Commun.*, 2005, 26, 1400–1405. <https://doi.org/10.1002/marc.200500410>
 11. *Ronkvist A., Xie W., Lu W., Gross R.* Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules*, 2009, 42, 5128–5138. <https://doi.org/10.1021/ma9005318>
 12. *Shirke A., Basore D., Butterfoss G., Bonneau R., Bystroff C., Gross R.* Towards rational thermostabilization of *Aspergillus oryzae* cutinase: Insights into catalytic and structural stability. *Proteins*, 2016, 84, 60–72. <https://doi.org/10.1002/prot.24955>
 13. *Yang S., Xu H., Yan Q., Liu Y., Zhou P., Jiang Z.* A low molecular mass cutinase of *Thielavia terrestris* efficiently hydrolyzes poly(esters). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 40, 217–226. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1222-x>
 14. *Malafatti-Picca L., de Barros Chaves M.R., de Castro A.M., Valoni E., de Oliveira V.M., Marsaioli A.J., de Franceschi de Angelis D., Attili-Angelis D.* Hydrocarbon-associated substrates reveal promising fungi for poly(ethylene terephthalate) (PET) depolymerization. *Brazilian J. Microbiol.* 2019, 50(3), 633–648. doi: 10.1007/s42770-019-00093-3.
 15. *Sooksai T., Bankeeree W., Sangwatanaroj U., Lotrakul P., Punnapayak H., Prasongsuk S.* Production of cutinase from *Fusarium falciforme* and its application for hydrophilicity improvement of polyethylene terephthalate fabric. *3 Biotech.*, 2019, 9, 389. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1931-1>
 16. *Nimchua T., Punnapayak H., Zimmermann W.* Comparison of the hydrolysis of polyethylene terephthalate fibers by a hydrolase from *Fusarium oxysporum* LCH I and *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Biotechnol. J.*, 2007, 2, 361–364. <https://doi.org/10.1002/biot.200600095>
 17. *Dimarogona M., Nikolaivits E., Kanelli M., Christakopoulos P., Sandgren M., Topakas E.* Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential. *BBA – General Subject*, 2015, 1850, 2308–2317. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.08.009>
 18. *Alisch-Mark M., Herrmann A., Zimmermann W.* Increase of the hydrophilicity of polyethylene terephthalate fibres by hydrolases from *Thermomonospora fusca* and *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Biotechnol. Lett.*, 2006, 28, 681–685. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9041-7>
 19. *Ahuactzin-Pérez M., Tlecuitl-Beristaine S., García-Dávila J., González-Pérez F.M., Gutiérrez-Ruiz M., Sánchez C.* Degradation of di(2-ethylhexyl)phthalate by *Fusarium culmorum*: Kinetics, enzymatic activities and biodegradation pathway based on quantum chemical modeling pathway based on quantum chemical modeling. *Sci. Total Environ.*, 2016, 566–567, 1186–1193. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.169>
 20. *Pozdnyakova N.N., Varese G.C., Prigione V., Dubrovskaya E.V., Balandina S.A., Turkovskaya O.V.* Degradative properties of two newly isolated strains of the ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Lecanicillium aphanocladii*. *Int. Microbiol.*, 2019, 22, 103–110. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-0032-z>
 21. *Peterson S.W., Jurjevic Z.* The *Talaromyces pinophilus* species complex. *Fungal Biology*, 2019, 123, 745–762. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.06.007>
 22. *Bezalel L., Hadar Y., Fu P., Freeman J., Cerniglia C.* Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62, 2547–2553. <https://doi.org/10.1128/aem.62.7.2547-2553.1996>
 23. *Cooper D., Goldenberg B.* Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53, 224–229. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>
 24. *Niku-Paavola M., Karhunen E., Salola P., Raunio V.* Ligninolytic enzymes of the white rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochem. J.*, 1988, 254, 877–884. <https://doi.org/10.1042/bj2540877>
 25. *Alish M., Feuerhack A., Muller H., Mensak B., Andreaus J., Zimmermann W.* Biocatalytic modification of polyeth-

- ylene terephthalate fibres by esterases from actinomycete isolates. *Biocatal. Biotrans.*, 2004, 22, 347–351. <https://doi.org/10.1080/10242420400025877>
26. Sowmya H.V., Ramalingappa, Krishnappa M., Thippeswamy B. Degradation of polyethylene by *Trichoderma harzianum* – SEM, FTIR, and NMR analyses. *Environ. Monit. Assess.*, 2014, 186, 6577–6586. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3875-6>
 27. Reyes-Cesar A., Absalon A., Fernandez F., Gonzalez J., Cortes-Espinosa D. Biodegradation of a mixture of PAHs by non-ligninolytic fungal strains isolated from crude oil-contaminated soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 30, 999–1009. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1518-7>
 28. Mendez-Liter J., de Eugenio L.I., Nieto-Dominguez M., Prieto A., Martinez M.J. Hemicellulases from *Penicillium* and *Talaromyces* for lignocellulosic biomass valorization: A review. *Bioresource Technol.*, 2021, 324, 124623. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124623>
 29. Krivobok S., Miriouchkine E., Seigle-Murandi F., Benoit-Guyod J.-L. Biodegradation of anthracene by soil fungi. *Chemosphere*, 1998, 37, 523–530. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00067-8)
 30. Vroumsia T., Steiman R., Seigle-Murandi F., Benoit-Guyod J.-L. Effects of culture parameters on the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) by selected fungi. *Chemosphere*, 1999, 39, 1397–1405. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00042-9)
 31. Luft L., Confortin T.C., Toderio I., Zobot G.L., Mazutti M.A. An overview of fungal biopolymers: bioemulsifiers and biosurfactants compounds production. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2020. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1805405>
 32. Da Silva A.F., Banat I.M., Giachini A.J., Robl D. Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2021, 44, 2003–2034. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02597-5>
 33. Sanches M., Luzeiro I., Cortez A., de Souza E., Albuquerque P., Chopra H., de Souza J. Production of biosurfactants by Ascomycetes. *Int. J. Microbiol.*, 2021, Article ID 6669263. <https://doi.org/10.1155/2021/6669263>
 34. Qazi M., Kanwal T., Jadoon M., Ahmed S., Fatima N. Isolation and characterization of a surfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8 from oil contaminated soil. *Biotechnol. Prog.*, 2014, 30, 1065–1075. <https://doi.org/10.1002/btpr.1933>
 35. Espino-Rammer L., Ribitsch D., Przylucka A., Marold A., Greimel K., Acero E., Guebitz G., Kubicek C., Druzhinina I. Two novel class II hydrophobins from *Trichoderma* spp. stimulate enzymatic hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) when expressed as fusion proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013, 79, 4230–4238. <https://doi.org/10.1128/AEM.01132-13>
 36. Chen S., Su L., Billig S., Zimmermann W., Chen J., Wu J. Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, 63, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.01.001>
 37. Kawai F., Oda M., Tamashiro T., Waku T., Tanaka N., Yamamoto M., Mizushima H., Miyakawa T., Tanokura M. A novel Ca²⁺-activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98, 10053–10064. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5860-y>
 38. Purdy R., Kolattuk P. Depolymerization of a hydroxy fatty-acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani* f. pisi – isolation and some properties of enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1973, 159, 61–69. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(73\)90429-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(73)90429-3)
 39. Horn S., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Eijsink V. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol. Biofuels*, 2012, 5, 45. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-45>
 40. Gan Q., Allen S., Taylor G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling. *Process Biochem.*, 2003, 38, 1003–1018. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00220-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00220-0)
 41. Barth M., Oeser T., Wei R., Then J., Schmidt J., Zimmermann W. Effect of hydrolysis products on the enzymatic degradation of polyethylene terephthalate nanoparticles by a polyester hydrolase from *Thermobifida fusca*. *Biochem. Eng. J.*, 2015, 93, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.012>
 42. Lopez M., Vargas-Garcia M., Suarez-Estrella F., Nichols N., Dien B., Moreno J. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycetes *Coniochaeta ligniaria* and related species: Application for a lignocellulosic substrate treatment. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2007, 40, 794–800. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.06.012>
 43. Obruca S., Marova I., Matouskova P., Haronikova A., Lichnova A. Production of lignocelluloses-degrading enzymes employing *Fusarium solani* F-552. *Folia Microbiol.*, 2012, 57, 221–227. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0098-5>
 44. Saparrat M., Balatti P., Martinez M., Jurado M. Differential regulation of laccase gene expression in *Coriopsis rigida* LPSC 232. *Fungal Biol.*, 2010, 114, 999–1006. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.09.010>
 45. Pant D., Adholeya A. Concentration of fungal ligninolytic enzymes by ultrafiltration and their use in distillery effluent decolorization. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 25, 1793–1800. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0079-2>
 46. Huy N., Tien N. Huyen L., Quang H., Tung T., Luong N., Park S.-M. Screening and production of manganese peroxidase from *Fusarium* sp. on residue materials. *Mycobiology*, 2017, 45, 52–56. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.1.52>

Ability of Ascomycetes to Transform Polyethylene Terephthalate

N. N. Pozdnyakova^{a, #}, A. M. Burov^a, E. A. Antonov^b, A. V. Aleksandrova^b, and O. V. Turkovskaya^a

^a*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms,
Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia*

^b*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

[#]*e-mail: pozdnyakova_n@ibppm.ru*

Abstract—The ability of soil-inhabiting ascomycetes *Lecanicillium aphanocladii*, *Talaromyces sayulitensis*, *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* to use polyethylene terephthalate (PET) as the sole carbon and energy source has been shown. Utilization of PET by the studied fungi, except for *L. aphanocladii*, was accompanied by the production of emulsifying compounds. All fungi exhibited the activity of cutinase, the key PET depolymerization enzyme, and a number of oxidoreductases, apparently catalyzing the oxidation of the resulting products: peroxidases in *F. oxysporum* and *T. harzianum*, as well as peroxidases and oxidases in *L. aphanocladii* and *T. sayulitensis*. The data obtained can be used to develop environmental biotechnologies and contribute to understanding of the processes of degradation/transformation of plastics in natural ecosystems.

Keywords: polyethylene terephthalate, ascomycetes, cutinase, peroxidase, oxidase, surfactants