

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 582.284.5: 577.158.36.07 577.152.9

Н.В. ШАХОВА¹, С.А. ГОЛЕНКИНА², Е.В. СТЕПАНОВА², Д.С. ЛОГИНОВ², Н.В. ПСУРЦЕВА¹,
Т.В. ФЕДОРОВА², О.В. КОРОЛЕВА^{2,*}

¹ Учреждение Российской академии наук Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, 197376

² Учреждение Российской академии наук Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, Москва, 119071

e-mail: koroleva@inbi.ras.ru

Влияние условий глубинного культивирования и индукторов на биосинтез внеклеточной лакказы штаммом *Trametes versicolor* 1666

Проведен генетический анализ базидиомицета *Trametes versicolor* 1666 из коллекции ЛЕБИН, Ботанического института им. А.Н. Комарова РАН, который подтвердил указанную таксономическую принадлежность штамма и показал наличие одного гена лакказы. Исследование динамики культивирования базидиомицета выявило низкий уровень продукции лакказы, пероксидазы и Mn-пероксидазы на глюкозо-пептонной и минеральной средах. Уровень активности лакказы в культуральной жидкости (КЖ) оставался практически неизменным при культивировании на среде, оптимизированной с использованием полного факторного эксперимента (по сравнению с таковым на традиционной среде). Внесение индукторов лакказ (сирингалдазина, кофейной кислоты и синаповой кислоты) не оказывало влияния на активность фермента в КЖ. Методом ПЦР-РВ показано отсутствие достоверного отличия в уровне экспрессии гена лакказы при культивировании штамма в оптимальных условиях без и в присутствии ионов меди в среде. Характер транскрипции гена лакказы и наличие ферментативной активности при культивировании *T. versicolor* 1666 указывают на ее конструктивный характер и существование дополнительных путей регуляции экспрессии соответствующего гена.

Ключевые слова: базидиомицет, ген, идентификация, индукция фермента, лакказа, пероксидаза, полный факторный эксперимент, транскрипты мРНК лакказы.

Базидиомицеты, относящиеся к грибам белой гнили, являются эффективными деструкторами лигнина — одного из наиболее устойчивых к химическому и микробному разрушению биополимеров [1, 2]. Основными ферментами, участвующими в процессе биоразложения лигнина базидиальными грибами, являются лигнин-пероксидаза, марганец-пероксидаза и лакказа. Различные виды базидиомицетов синтезируют как отдельные лигнолитические ферменты, так и мультиферментные комплексы; роль отдельных ферментов в про-

цессах биотрансформации и биodeградации лигнина остается предметом изучения на протяжении последних нескольких десятилетий [2, 3].

В настоящее время ключевым ферментом в деградации лигнина принято считать лакказу, так как большинство изученных грибов-делигнификаторов синтезируют лакказу и Mn-пероксидазу или только лакказу для осуществления трансформации и минерализации этого биополимера. Лакказа (монофенол дигидроксифенилаланин: кислород оксидоредуктаза, КФ 1.14.18.1) — медьсодержащая ок-

Шахова Наталья Витальевна, Голенкина Софья Александровна, Степанова Елена Владимировна, Логинов Дмитрий Сергеевич, Псурцева Надежда Васильевна, Федорова Татьяна Васильевна, Королева Ольга Владимировна.

Список сокращений: ДИК — дифференциально-интерференционный контраст; КЖ — культуральная жидкость; ОП — оптическая плотность; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ПЦР-РВ — ПЦР в реальном времени; ПФЭ — полный факторный эксперимент; ЭДТА — этилендиаминтетраацетат; АВТС — 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота); dNTP — дезоксирибонуклеозидтрифосфат(ы).

* Автор для переписки.

сидаза, катализирующая реакцию восстановления молекулярного кислорода различными органическими (орто- и пара-дифенолами, аминифенолами, полифенолами, полиаминами, лигнинами и арилдиаминами) и неорганическими соединениями до воды, минуя стадию образования перекиси водорода. Данный фермент обладает широкой субстратной специфичностью, достаточно высокой стабильностью и способностью окислять в присутствии соответствующих редокс-медиаторов соединения, которые не являются его традиционными субстратами. Благодаря этим свойствам лакказы находят применение в различных областях биотехнологии: при детоксикации и делигнификации промышленных отходов, для обесцвечивания сточных вод и бумажной пульпы, в тонком органическом синтезе и биосенсорных технологиях [4, 5]. Возможности широкого биотехнологического использования фермента определяют необходимость исследования условий культивирования продуцентов для достижения максимального выхода фермента при минимальных затратах на его получение.

Попытки увеличить уровень экспрессии фермента включают оптимизацию условий и среды культивирования, внесение индукторов, ксенобиотиков и т.д. [6—12]. Данные подходы применяют для природных штаммов, синтезирующих значительное количество конститутивной формы фермента с высокой активностью.

Одним из наиболее изученных базидиомицетов является *Trametes versicolor* (*Coriolus versicolor*), порядок Polyporales, сем. Polyporaceae, ксилотроф, обитающий на валежных стволах и ветвях лиственных деревьев. Различные штаммы *T. versicolor* синтезируют внеклеточные лакказы с активностью до 450 ед/мл [13, 14]. Использование индукторов и оптимизация среды культивирования позволяют значительно повысить ферментативную активность; при этом в ряде работ установлено, что индуцибельная форма фермента значительно отличается от конститутивной как по физико-химическим свойствам, так и по субстратной специфичности [15, 16]. Однако в литературе отсутствуют сведения о продукции индуцибельных форм лакказ грибами, синтезирующими конститутивную форму фермента с низкой активностью, хотя исследования такого рода могут дать возможность получить информацию о механизмах экспрессии лакказ.

В результате ранее проведенных нами исследований было установлено, что штамм 1666 из коллекции культур базидиомицетов ЛЕБИН является продуцентом лакказы, однако ферментативная активность внеклеточного фермента в КЖ низкая.

Целью настоящей работы являлось изучение влияния условий глубинного культивирования и индукторов лакказы на биосинтез внеклеточного фермента штаммом *T. versicolor* 1666.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Происхождение штамма. Исследуемый штамм 1666 был получен из базидиоспор агарикоидного гриба *Flammulaster limulatooides* (P.D. Orton), собранного в 2002 г. в Валдайском национальном парке (Новгородская область). В коллекции культур базидиомицетов ЛЕБИН Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН штамм хранился в пробирках на сусло-агаре (сусло (Maltex) — 4%, агар (Reanal, Венгрия) — 1,5 %) при 4°. Для исследований штамм был отобран по результатам экспресс-теста на лакказную активность. В дальнейшем культура была реидентифицирована с использованием анализа ДНК как *Trametes versicolor* (Linnaeus: Fries) Lloyd.

Культурально-морфологическая характеристика штамма. Культуру выращивали в стерильных условиях на чашках Петри (90 мм) на сусло-агаровой питательной среде (4% суслы и 2% агара) в темноте при 25°. Посев штаммов проводили мицелиальными блоками (диаметром 5 мм), помещая их на питательную среду на краю чашки Петри мицелиальным слоем вниз. Рост штамма характеризовали по радиусу колонии на 7-е, 14-е, 21-е и 28-е сутки роста, оценивая его скорость по времени сплошного зарастания на чашке: быстрый рост — 1 нед, средний — 2—3 нед и медленный — 4 нед и более.

Характеристику макро- и микроморфологических особенностей мицелиальных колоний проводили с использованием метода и терминологии Сталперса [17]. Макроморфологическая характеристика включала описание воздушного мицелия, цвета, запаха и реверзума колоний. Микроморфологические особенности изучали с использованием световых микроскопов «Микромед» (ЛОМО, Россия) и Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) методами светлого поля и дифференциально-интерференционного контраста (ДИК). При описании гифальной системы отмечали наличие на мицелии вздутий, пряжек и анаморф (структуры бесполого размножения), используя общепринятую терминологию. Стадию телеоморфы (плодообразование) в культуре получали как на агаризованной среде в чашках Петри при комнатной температуре и естественном освещении, так и на субстратных блоках (березовые опилки с пшеничными отрубями (3:1)) в климатической камере MLR-351H

(Sanyo, Япония) при заданных параметрах (2500 лк, 15° и относительной влажности 85%).

Типирование штамма методом ПЦР-анализа было проведено на основании частичного определения нуклеотидной последовательности 18S, 5.8S и 28S рибосомной РНК, а также последовательности ДНК (ITS1- и ITS2-участков) с использованием специфических праймеров. Полученные данные сравнивали с последовательностями, имеющимися в банке данных (GeneBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с целью определения наиболее близкородственного к исследуемому организму штамма. Идентичность устанавливали при уровне гомологии 99—100%.

Аmplификацию и секвенирование ДНК проводили с использованием универсальных для базидиомицетов праймеров ITS1F-ITS4B:

ITS1F — 5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A -3'

ITS4B — 5'- CAG GAG ACT TGT ACA CGG TCC AG -3'.

ПЦР проводили по следующей программе: 1 цикл (5 мин 95°), далее 30 циклов (1 мин 90°, 1 мин 60°, 1 мин 72°) и 1 цикл (10 мин 72°).

Для амплификации использовали термополимеразу Long PCR Enzyme Mix (Fermentas, Литва) и dNTP (Fermentas). Концентрации реагентов при проведении ПЦР соответствовали данным протоколов, сопровождающих использованный набор. Выделение ДНК из образца проводили с помощью набора DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Германия). Выделение ДНК из геля осуществляли с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

Электрофорез образцов ДНК. Электрофорез продуктов ПЦР проводили в буфере TAE (2M Trizma-base (Sigma, США); 0,05 M ЭДТА (Sigma); 1,56 M уксусная кислота (Panreac, Испания), pH 7,6) в 1%-ном агарозном геле при напряженности электрического поля 2—3 В/см. Образец ДНК смешивали с 10-кратным буфером для нанесения (0,1% бромфенолового синего, 50% глицерина, 0,1 M ЭДТА, pH 8,0) в соотношении 9:1. Полученные фрагменты визуализовали с помощью бромистого этидия ("Хеликон", Россия) при длине волны 260 нм на трансиллюминаторе TSP-20 LC (VILBER LOURMAT, ЕС). Секвенирование ДНК проводили в Межгосударственном центре коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant.

Экспресс метод определения лакказной активности. Активность лакказы экспресс-мето-

дом определяли через 1 нед, 2, 3 и 4 нед роста штамма. Штамм выращивали так же, как и для культуральной характеристики. При определении активности лакказы около растущего края колонии вырезали 5-миллиметровые мицелиальные блоки и использовали для дальнейших тестов. Штаммы тестировали методом быстрого скрининга по интенсивности окрашивания мицелиального блока гваяколом (Sigma) (2%) и сирингалдазином (Sigma, США) (0,1% в 95%-ном C₂H₅OH). Качественную реакцию регистрировали через 5 мин, 15, 30, 60 мин, 3 ч и 24 ч. Опыты проводили не менее чем в трех биологических и аналитических повторностях.

Определение гена лакказы в исследуемом штамме. Поиск генов, кодирующих лакказу, осуществляли с использованием универсальных праймеров на нуклеотидные последовательности консервативных аминокислотных участков, отвечающих за координацию ионов меди, LacA1 For 5'-CA(CT) TGG CA(CT) GG(AT) TT(TC) TT(TC) CA(AG)-3, LacA1L For 5'-CA(CT) TGG CA(CT) GG(AT) TT(TC) (CT)T(GC) CA(AG)-3', LacA2 For 5'-T(TA)(TC) TGG TA(TC) CA(CT) (TA)(CG)T CA(CT) (CT)TA-3', LacA4 Rev 5'-(AG)TG (AT)CC (AG)TG (TA)AG (AG)TG (GA)AA (AT)GG (AG)TG-3' и LacA5 Rev 5'-(AG)TG (AG)AA (AG)TC·(AGT)AT·(AG)TG·(AG)CA·(AG)TG-3' [18]. ПЦР проводили, используя эти праймеры, а также геномную ДНК исследуемого штамма по следующей программе: 1 цикл (5 мин, 95°), далее 5 циклов (1 мин, 90°; 2 мин, 65°; 1 мин, 72°), 5 циклов (1 мин, 90°; 2 мин, 62°; 1 мин, 72°), 10 циклов (1 мин, 90°; 2 мин, 60°; 1 мин, 72°), 10 циклов (1 мин, 90°; 2 мин, 58°; 1 мин, 72°) и 1 цикл (10 мин, 72°). Концентрации компонентов ПЦР были такие же, как и в случае определения видовой принадлежности базидиомицетов с помощью ПЦР.

Глубинное культивирование штаммов проводили на среде следующего состава, г/л: NaNO₃ (или пептон) — 3,0; глюкоза — 14,0; KH₂PO₄ — 0,6; K₂HPO₄ — 0,4; ZnSO₄ — 0,001; FeSO₄ — 0,0005; MnSO₄ — 0,05; MgSO₄ — 0,5; CuSO₄ — 0,35, pH 6,0, на круговой качалке в колбах емкостью 0,75 л при 180 об/мин в течение 8—10 дней. Ферментативную активность определяли в культуральном фильтрате в динамике роста начиная с 4-х суток культивирования. В качестве инокулюма использовали 5-суточную культуру, выращенную на среде вышеприведенного состава, но не содержащую ионы меди, в статических условиях при температуре 28°.

Для оптимизации питательной среды при глубинном культивировании *T. versicolor* 1666 использовали метод многофакторного эксперимен-

та. Полный факторный эксперимент (ПФЭ) 3^3 был выполнен согласно методике [19]. Каждый переменный параметр имел 3 уровня варьирования: +1, 0 и -1 (табл. 1). Было изучено 15 вариантов культивирования гриба *T. versicolor* 1666 в трех повторностях каждый; указанные варианты были отобраны из 27 вариантов по наличию достоверно измеряемой активности. Расчет и оценка значимости регрессионных коэффициентов проводили согласно алгоритму Иейтса [19]. Оптимальные значения каждого из варьируемых параметров были определены графическим (программа STATISTICA 6.0) и расчетным методами.

Культивирование в присутствии индукторов. Влияние индукторов на биосинтез лакказы *T. versicolor* 1666 исследовали в условиях глубокого культивирования на среде оптимизированной для продукции фермента состава. В качестве контроля исследуемый штамм выращивали на среде культивирования без добавления индукторов. На 5-е сутки культивирования вносили различные индукторы: сирингалдазин ($0,042 \cdot 10^{-6}$ М), синаповую кислоту ($50 \cdot 10^{-6}$ М) и кофейную кислоту ($50 \cdot 10^{-6}$ М) (Sigma, США). Эксперимент проводили в пяти повторностях.

Определение ферментативной активности

Активность лакказы регистрировали спектрофотометрически (Perkin Elmer, Lambda 25, США) при λ 410 нм, используя в качестве субстрата 10 мМ раствор пирокатехина (Sigma) в 0,1 М Na-ацетатном буфере, pH 4,5. За единицу ферментативной активности принимали количество лакказы, обеспечивающее увеличение ОП на 0,05 ед. в 1 мл реакционной смеси за 1 мин.

Пероксидазную активность определяли при λ 436 нм с использованием 10 мМ раствора ABTS в 0,1 М Na-ацетатном буфере, pH 4,5, в качестве субстрата в присутствии 3%-ной H_2O_2 . За единицу активности принимали количество пероксидазы, способствующее увеличению ОП на 0,05 ед. в 1 мл реакционной смеси за 1 мин.

Mn-пероксидазную активность определяли, используя в качестве субстрата реакционную смесь, содержащую 0,1 М тартратный буфер, pH 5,0; 0,1 мМ H_2O_2 и 0,1 мМ $MnSO_4$, при λ 238 нм ($\varepsilon = 6500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). За единицу активности принимали количество Mn-пероксидазы, обеспечивающее окисление 1 мкмоль Mn (II) за 1 мин.

Таблица 1

Матрица многофакторного эксперимента по подбору условий культивирования *T. versicolor* 1666

№ опыта (среды)	Компоненты среды, г/л			Уровни факторов			Лакказная активность, ед/мл
	CuSO ₄	Глюкоза	NaNO ₃	X1	X2	X3	
1	0,25	10	2	-1	0	-1	0,039
2	0,35	10	2	1	0	-1	0,028
3	0,25	16	2	-1	1	-1	0,031
4	0,35	16	2	1	1	-1	0,030
5	0,25	4	4	-1	-1	0	0,027
6	0,35	4	4	1	-1	0	0,037
7	0,25	10	4	-1	0	0	0,029
8	0,35	10	4	1	0	0	0,042
9	0,25	16	4	-1	1	0	0,023
10	0,35	16	4	1	1	0	0,028
11	0,25	4	6	-1	0	1	0,032
12	0,35	4	6	1	0	1	0,028
13	0,25	10	6	-1	0	1	0,039
14	0,35	10	6	1	0	1	0,039
15	0,35	16	6	1	1	1	0,028

Определение уровня экспрессии гена лакказы в исследуемом штамме при культивировании в присутствии ионов меди осуществляли методом ПЦР в реальном времени. В качестве контроля использовали культуру исследуемого штамма, выращенную без добавления ионов меди. Культивирование проводили на круговой качалке в колбах (0,75 л) при 180 об/мин в течение 8—10 сут.

Тотальную РНК выделяли с использованием набора реактивов RNease Minikit (QIAGEN), согласно методике, предложенной производителем и адаптированной для растительного материала и filamentных грибов. Выделенную РНК анализировали с помощью элетрофореза в агарозном геле; концентрацию выделенной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Германия). Тотальную РНК (1 мкг) использовали в качестве матрицы для синтеза одноцепочечной комплементарной ДНК в реакции обратной транскрипции.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием случайных праймеров и реактивов из набора ImProm-IT[™] Reverse Transcriptase System (Promega, США), согласно инструкции, предложенной производителем. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени.

ПЦР в реальном времени проводили с использованием праймеров, специфичных к участкам матричной РНК гена лакказы, перекрывающим места стыков двух соседних экзонов: TvLac1For—5'-TTGAGCTGGAAGCGGTCTCCC-TT-3' и TvLac1Rev—5'-TAGTATCCACTGGCACGGCTTCTT-3'. Праймеры были подобраны на основе выравнивания последовательностей мРНК лакказы гриба *T. versicolor*, имеющихся в банке данных NCBI (GeneBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Праймеры gpdf (5'-CGGCTTCGGTCGATTTGG-3') и gpdr (5'-TGGAGGAGGGGATGATGTT-3') [20] использовали для амплификации фрагмента референс-гена, в качестве которого был выбран ген «домашнего хозяйства», кодирующий глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу. ПЦР проводили с использованием комплекта реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I (Синтол, Россия), согласно инструкции производителя. Амплификацию осуществляли на приборе iCycler iQ4 (Bio-Rad, США) по следующей программе: 1 цикл (5 мин, 95°), далее 35 циклов (15 с, 95°; 15 с, 56°; 15 с, 72°). Специфичность продуктов амплификации проверяли путем построения кривых плавления. Сравнительный анализ экспрессии гена лакказы в

образцах проводили с помощью метода $2^{-\Delta\Delta C}$ [21]. Эксперимент осуществляли не менее, чем в трех биологических и аналитических повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемый штамм *T. versicolor* 1666 отличался средней для базидиомицетов скоростью роста — колония полностью покрывала чашку Петри за 2 нед, т.е. ее радиус достигал 75 мм на 14-е сутки роста. Изучение макроморфологических особенностей штамма показало, что при выращивании на агаризованном сусле образовывались шерстисто-ватные, местами лакунозные, неоднородные по плотности мицелия колонии белого цвета, иногда с бледно-желтыми участками, с неизменным реверзумом (рис. 1), без запаха. При исследовании микроморфологических характеристик было выявлено, что воздушный мицелий состоял из генеративных септированных гиф шириной 2—5 мкм с невыраженными редко встречающимися утолщениями, без пружек. В поле зрения при микроскопировании регулярно встречались многочисленные артроконидии и кристаллы. Скелетные гифы обнаружены не были. Использование метода ДИК дало возможность наблюдать стадию образования артроконидий путем септирования как терминальных, так и интеркалярных участков гиф. Плодовые тела в культуре получить не удалось ни при выращивании на агаризованном сусле в чашках Петри, ни на опилочных блоках, несмотря на неоднократную постановку эксперимента.

Полученная культуральная характеристика не дала возможности ни опровергнуть, ни надежно подтвердить таксономическую принадлежность штамма, поэтому ее верификация была продолжена молекулярными методами.

Молекулярно-генетические характеристики грибов в настоящее время являются одним из ос-

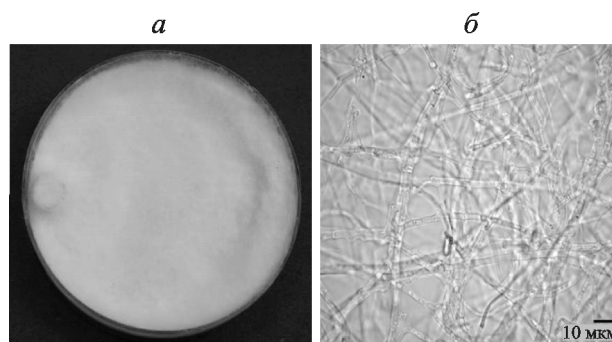


Рис. 1. Макро- (а) и микроморфологическая (б) (с помощью микроскопа «Микромед», ЛОМО, Россия) характеристики *T. versicolor* 1666

новых параметров для филогенетического позиционирования родов и видов. Тем не менее, в большинстве работ (по крайней мере, до 2003 г.) приводится последовательность ДНК только одного локуса, кодирующего рибосомную РНК [22], хотя более корректные результаты могут быть получены при определении последовательности ряда локусов, в том числе митохондриальной ДНК. Поэтому для типирования отобранных грибных штаммов было проведено частичное определение нуклеотидной последовательности 18S, 5.8S и 28S рибосомной РНК, а также последовательности ДНК, находящейся между генами, кодирующими 18S, 5.8S и 28S рибосомные РНК (ITS1 и ITS2 регионы).

Для этого проводили ПЦР с праймерами ITS1 и ITS4В с использованием хромосомной ДНК исследуемого базидиального штамма. Далее определяли нуклеотидную последовательность полученных ПЦР-фрагментов и эти данные сравнивали с имеющимися в банке данных (GeneBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с целью определения наиболее близкородственного к исследуемому организму штамма. В случае, если уровень гомологии составлял 99—100%, делали вывод об идентичности исследуемого штамма имеющемуся в банке данных. Ниже приведена нуклеотидная последовательность ПЦР-фрагмента, полученная с использованием праймеров ITS1 и ITS4В:

```
5'-ТААСААГГТТССГТАГГТГААССТГСГГ  
ААГГАТСАТТАААСГАГТТТГГААСГАГТТГ  
ТАГСТГГССТТССГАГГАТГТГСАСГСТСТ  
ГСТСАТССАСТСТАССССТГТГСАСТТАСТГТ  
АГГТТГГСГТГГГСТССТТААСГГГАГСАТТ  
СТГССГГССТАТГТАТАСТААААССТТТАА  
АГТАТСАГААТГТТАААСГСГТСТААСГСАТ  
ТАТААТАСААСТТТТАААААСГГАТСТСТТГГ  
СТСТСГАТГАТГААГААААААААААААА  
СГАТАААААААААААААААААААААААА  
ААТСАТГААТСТТТГААСГСАССТТГСГСТ  
ССТТГГТАТТССГАААААААААААААААА  
ГТГТСАТГАААТТСТСААСТТАААААААА  
ТГАТСТААААААААААААААААААААА  
ГГСССТТГСГГТССГГСТССТТТГААТГАТ  
ТАГСТСГАТТССГАТССГГАТССГГСТСТСА  
ГТГАТААТТГТСТСАСГТТГААААААААА  
ГТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТ  
СААСТТТТТАААААААААААААААААА  
АААААААААААААААААААААААААА  
АААААААААААААААААААААААААА  
ССССТАГАТАААТТТТТТТТТТТТТТТТ  
ГСТСАААА-3'.
```

Эта последовательность ПЦР-фрагмента полностью совпала с последовательностью ДНК 18S, 5.8S и 28S рибосомной РНК, а также с регионами ITS1 и ITS2 базидиомицета *T. versicolor* (номер в GeneBank gi: 138498335).

Следует отметить, что ростовые параметры и макроморфология колоний штамма 1666 вполне согласуются с описанными в литературе для культур *T. versicolor*. По микроморфологическим характеристикам исследуемый штамм отличался от *T. versicolor* отсутствием пряжек и скелетных гиф, а также наличием структур бесполого размножения – артроконидий [17, 23].

Однако, учитывая 100%-ную гомологию последовательностей фрагментов ДНК исследуемого штамма с данными, представленными в GeneBank NCBI, штамм 1666 был реидентифицирован как *T. versicolor*.

Исследование штамма *T. versicolor* 1666 экспресс-методом на наличие окислительных ферментов показало, что при росте на твердом субстрате он синтезировал внеклеточную лакказу. Качественные цветные реакции на синингалдазин и гваякол обнаружили, что исследуемый штамм обладал достаточно высокой способностью окислять эти органические субстраты.

Главным недостатком экспресс-метода является наличие ложноположительных ответов, что, по-видимому, связано с продукцией грибами феноксидаз и/или комплекса ферментов, способных образовывать перекись водорода, которая служит одним из субстратов пероксидазы. Поэтому был проведен анализ геномной ДНК штамма *T. versicolor* 1666 для установления наличия генов лакказы.

Известно, что лакказы базидиальных грибов могут кодироваться сложным семейством генов, причем в одном штамме может содержаться как один ген (лакказа из *T. hirsuta*), так и несколько генов, кодирующих разные изоферменты (лакказа из *P. ostreatus*) [24].

В результате амплификации был получен одиночный фрагмент ПЦР, содержащий 1600 п.н., что может свидетельствовать о наличии единственного гена лакказы в этом базидиомиците. В качестве контроля при проведении ПЦР с той же парой универсальных праймеров была использована геномная ДНК штамма *T. hirsuta*. На основании полученных результатов можно сделать заключение, что штамм *T. versicolor* 1666 содержит, по-видимому, один ген лакказы, что согласуется с литературными данными. Следует отметить, что количество генов лакказы в геномах различных штаммов одного и того же вида *T. versicolor* варьирует

от одного [25] или двух [26] до четырех [27]. Однозначно установить количество генов в геноме штамма достаточно сложно, так как для этого необходимо проводить полное секвенирование генома базидиомицета. С помощью метода ПЦР определить количество генов, которые содержит исследуемый штамм, не представляется возможным, поскольку гены лакказы содержат интроны, и если положение интрона в одном из генов изофермента приходится на область, комплементарную одному из праймеров, то такой праймер будет неэффективен и продукт ПЦР в этом случае не образуется.

Для изучения динамики лакказной, пероксидазной и Mn-пероксидазной активности при глубинном культивировании *T. versicolor* 1666 использовали две питательные среды: среда I содержала глюкозу в качестве источника углерода, пептон как источник азота, а также макро- и микроэлементы, необходимые для роста гриба. Среда II имела тот же состав, но в качестве источника азота в нее вносили NaNO_3 . Полученные данные суммированы в табл. 2.

Максимальные значения активности лакказы, пероксидазы и Mn-пероксидазы наблюдались на 5-е сутки глубинного культивирования *T. versicolor* 1666 на среде I (0,0159 ед/мл, 0,0414 и 0,032 ед/мл, соответственно). При культивировании штамма на среде II лакказная и Mn-пероксидазная активности в КЖ были максимальными на 5-е и 4—5-е сутки, соответственно, а максимум пероксидазной активности приходился на 6-е сутки (см. табл. 2). Следует отметить, что для *T. versicolor* 1666 уровень продукции всех исследованных ферментов был достаточно низким, что отличает

исследованный штамм от других, описанных в литературе штаммов *T. versicolor* (см. например, [13, 14]). Кроме того, использование пептона в качестве источника азота обычно приводит к увеличению активности лигнолитических ферментов, что и наблюдалось при изучении динамики пероксидазной активности. Однако более высокая лакказная активность наблюдалась при глубинном культивировании на питательной среде II, содержащей неорганический источник азота (см. табл. 2).

Для оптимизации продукции лакказы базидиомицетом применяют различные методы, в том числе полные факторные эксперименты [28, 29]. Полный факторный эксперимент 3-го порядка (ПФЭ 3^3) для оптимизации среды культивирования штамма *T. versicolor* в отношении продукции лакказы включал следующие варьируемые параметры: концентрация глюкозы (источник углерода), концентрация NaNO_3 (источник азота) и концентрация CuSO_4 . Определение оптимальных значений варьируемых параметров было выполнено двумя методами: графическим и расчетным. Графическое решение ПФЭ 3^3 показало, что оптимальные значения варьируемых параметров лежат в диапазонах, г/л, 0,28—0,36, 8—12 и 3—5,5 для CuSO_4 , глюкозы и NaNO_3 , соответственно (рис. 2). При высоких концентрациях CuSO_4 и глюкозы наблюдалось снижение лакказной активности, что соответствует литературным данным [30, 31].

Однако значительного увеличения лакказной активности при достижении оптимальных условий культивирования получить не удалось. Поэтому для уточнения оптимального состава среды было рассчитано уравнение регрессии, описывающее ПФЭ 3^3 :

Таблица 2

Динамика накопления различных видов ферментативной активности штаммом *T. versicolor* 1666

Среда культивирования	Активность, ед/мл	Длительность культивирования, сут			
		4	5	6	8
Среда I (источника азота — пептон)	Лакказа	0,0156	0,0159	0,0129	0,0104
	Пероксидаза	0,0366	0,0414	0,0188	0,0411
	Mn-пероксидаза	0,024	0,032	0,012	0,012
Среда II (источника азота — NaNO_3)	Лакказа	0,0079	0,0291	0,0062	0
	Пероксидаза	0,0053	0,0105	0,0126	0,0095
	Mn-пероксидаза	0,0014	0,0012	0,0011	0,0011

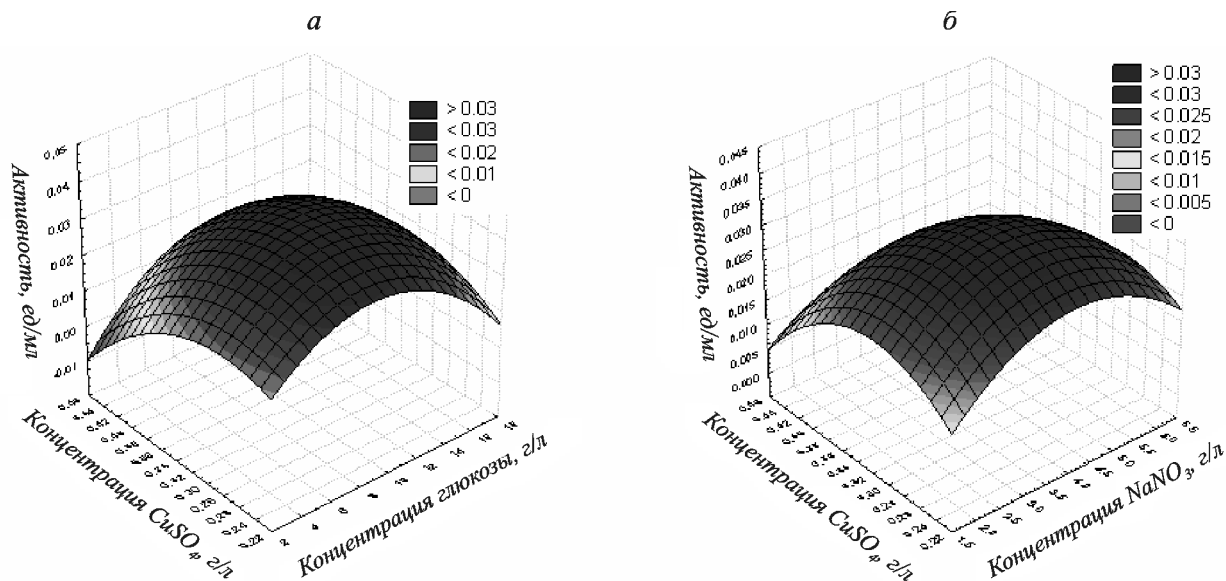


Рис. 2. Зависимость лакказной активности от концентрации глюкозы и CuSO_4 (а) и концентрации NaNO_3 и CuSO_4 (б) (полный факторный эксперимент 3^3)

$$\begin{aligned} \text{Лакказная активность} = & 0,035 - 0,0062 \times \\ & \times X_1 - 0,0117 \cdot X_1^2 - 0,00414 \cdot X_2^2 - 0,00045 \cdot X_1 \times \\ & \times X_2^2 - 0,00471 \cdot X_1^2 \cdot X_3 + 0,00512 \cdot X_3 - 0,0042 \cdot X_2 \times \\ & \times X_3 + 0,0075 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,00297 \cdot X_2^2 \cdot X_3 - \\ & - 0,00105 \cdot X_3^2 - 0,0094 \cdot X_1 \cdot X_3^2 - 0,00738 \cdot X_1^2 \cdot X_2 \times \\ & \times X_3^2 + 0,00492 \cdot X_2 \cdot X_3^2 + 0,00492 \cdot X_1^2 \times X_2 - \\ & - 0,00328 \cdot X_2 - 0,00531 \cdot X_2^2 \cdot X_3^2 + 0,0099 \cdot X_1 \times \\ & \times X_2^2 \cdot X_3^2. \end{aligned}$$

Сравнение расчетных и экспериментальных данных показало, что коэффициент детерминации (R^2) составляет 0,9698, что показывает 97%-ное соответствие эксперимента расчетной модели. В результате решения данного уравнения были определены оптимальные условия культивирования гриба *T. versicolor* 1666, которые составили, г/л, 0,31; 9,5 и 5,8 для CuSO_4 , глюкозы и NaNO_3 , соответственно.

Проведенная оптимизация среды культивирования обеспечила незначительное повышение лакказной активности, что позволило предположить отсутствие синтеза индуцибельной формы фермента. Известно, что индуцибельная форма синтезируется в присутствии индукторов в идиофазе (вторичный метаболизм). Согласно литературным данным, в качестве индукторов лакказы для *T. versicolor* использовали субстраты фермента фенольной природы, ксенобиотики, ионы металлов и др. [32, 33]. Анализ данных по индукции фермента у различных штаммов *T. versicolor* показал, что эффективные индукторы для различных штаммов различны, однако большинство фенольных соединений — субстратов лакказ — вызыва-

ет увеличение как биосинтеза индуцибельной формы, так и ее активности в среде культивирования. Поэтому в качестве индукторов лакказы при культивировании штамма *T. versicolor* 1666 использовали сирингалдазин, синаповую и кофейную кислоты, которые вносили на 5-е сутки культивирования (после практически полной утилизации источника углерода — глюкозы). Из полученных данных (рис. 3) следует, что внесение индукторов в процессе культивирования *T. versicolor* 1666 не приводит к значительному увеличению лакказной активности в среде культивирования, а в некоторых случаях наблюдается и снижение ферментативной активности. Полученные данные свидетель-

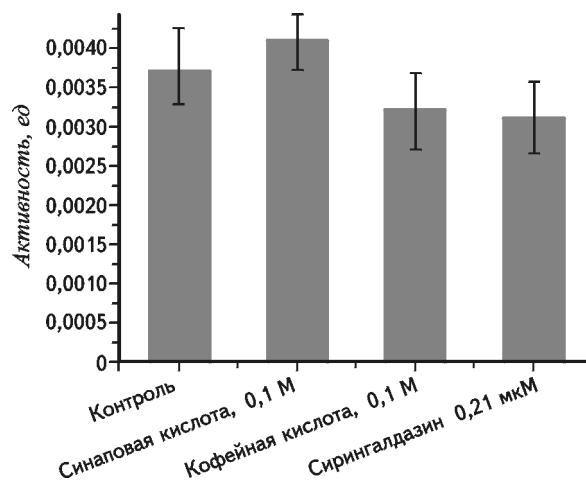


Рис. 3. Влияние индукторов на уровень активности внеклеточной лакказы при культивировании *T. versicolor*

ствуют об отсутствии синтеза индуцибельной формы лакказы штаммом *T. versicolor* 1666, что может быть связано с особенностями биосинтеза и метаболизма данного штамма.

Незначительное повышение лакказной активности при культивировании в присутствии оптимального количества CuSO_4 коррелирует с результатами, полученными при изучении транскрипционной активности гена лакказы у штамма *T. versicolor* 1666. Методом ПЦР в реальном времени было показано отсутствие достоверных различий в уровне экспрессии гена лакказы при культивировании штамма в различных физиологических условиях. В качестве внутреннего контроля, относительно которого оценивали эффективность амплификации целевого гена, был выбран ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Пороговая величина флуоресцентного сигнала для продукта амплификации гена «домашнего хозяйства» выполняла функцию референс-сигнала (рис. 4). Сравнительный анализ пороговых величин интенсивности флуоресцентного сигнала для исследуемых образцов показал статистически незначимое различие в количестве мРНК лакказы [21]. Полученные результаты указывают на крайне низкий уровень экспрессии гена лакказы у штамма *T. versicolor* 1666 на транскрипционном уровне.

Ранее уже проводились работы по изучению регуляции транскрипции гена лакказы у *T. versicolor* [6]. Было показано, что увеличение концентрации различных индукторов (ионы меди, нитраты, ароматические соединения) в среде культивирования приводит к значительному увеличению количества мРНК лакказы. Более того, установлено, что индукция лакказы возможна также при воздействии исключительно веществ фенольной природы в отсутствие ионов меди, однако их совместное действие более эффективно. Эти факты позволяют предполагать наличие в геноме или непосредственно в промоторе гена лакказы специфических последовательностей, на которые прямо или косвенно воздействуют молекулы-индукторы. Зависимость активности лакказы от концентрации ионов меди была подтверждена и обоснована в работе, где авторы исследовали функциональные свойства идентифицированных ими белков *T. versicolor*, гомологичных белкам медного обмена дрожжей: *CtaA* (медь-переносящая АТРаза Р-типа, гомолог гена *Ccc2p* дрожжей) и *TahA* (гомолог гена антиоксиданта *ATX1* дрожжей) [34]. Культивирование штамма дикого типа *T. versicolor*, в норме экспрессирующего как *CtaA*, так и *TahA*, при различных концентрациях меди приводило к почти десятикратному увеличению активности лакка-

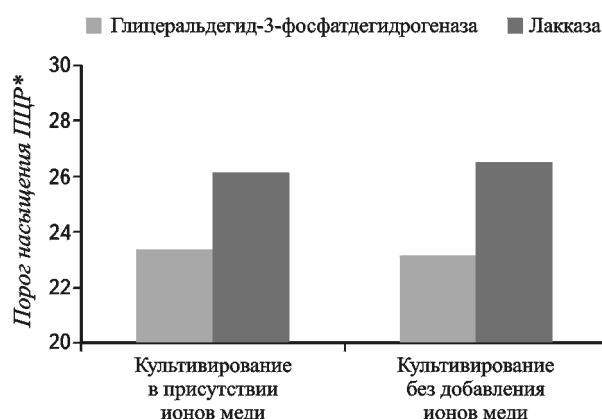


Рис. 4. Влияние ионов меди на экспрессию гена лакказы у *T. versicolor* 1666

* Номер первого цикла, в котором происходит достоверное увеличение флуоресцентного сигнала по сравнению с фоном

зы. Стоит отметить, что лакказная активность у штамма дикого типа проявлялась и в отсутствие ионов меди. Экспрессия генов, кодирующих каждый из медь-связывающих белков, под сильным конститутивным промотором при тех же физиологических условиях приводила к более значительному увеличению роста лакказной активности (в 4—5 раз по сравнению с таковой у дикого типа). В то же время, при совместной гиперэкспрессии *CtaA* и *TahA* наблюдали еще более интенсивное увеличение роста ферментативной активности (в 10 раз по сравнению с активностью дикого штамма *T. versicolor* [34]). Несмотря на отсутствие в указанной работе данных по транскрипционной активности гена лакказы ее результаты четко коррелируют и хорошо дополняют данные более ранних исследований регуляции лакказной активности у *T. versicolor*, и можно предполагать, что гены *CtaA* и *TahA*, присутствующие в геноме *T. versicolor* дикого типа, играют значительную роль в регуляции лакказной активности.

Однако внесение индукторов в среду культивирования штамма *T. versicolor* 1666, исследуемого в настоящей работе, не приводило к увеличению лакказной активности в КЖ. В то же время, оценка ферментативной активности и анализ транскрипции гена путем ПЦР в реальном времени доказывают наличие определенного уровня экспрессии гена лакказы, не зависящего от условий культивирования. Мы предполагаем, что причина данного феномена лежит в самом штамме *T. versicolor* 1666, у которого, вероятно, каким-то образом нарушено функционирование белков *CtaA* и *TahA*, что может быть связано с мутацией или с действием некой системы репрессии генов, кодирующих

белки обмена меди. Кроме того, поскольку известны случаи полного отсутствия лакказы в КЖ при наличии гена в геноме гриба, факты транскрипции мРНК лакказы и присутствия ферментативной активности у *T. versicolor* 1666 указывают на существование дополнительных путей регуляции экспрессии лакказы. Высказанные предположения, безусловно, нуждаются в дополнительных исследованиях метаболизма и регуляции биосинтеза лакказы у данного штамма, что представляет значительный интерес, так как до сих пор не получены рекомбинантные штаммы – продуценты лакказ с высоким уровнем как биосинтеза, так и экспрессии внеклеточных ферментов.

Работа поддержана грантами РФФИ № 08-04-01612 а и № 09-04-90748 моб ст и Федеральным агентством по образованию (ГК П1297).

Получено 29.12.10

ЛИТЕРАТУРА

1. Hatakka, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation // FEMS Microbiol. Rev. — 1994. — V. 13. — P. 125—135.
2. Martinez, A.T. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin / A.T. Martinez, M. Speranza, F.J. Ruiz-Duenas, P. Ferreira, S. Camarero, F. Guillen, M.J. Martinez, A. Gutierrez, J.C. del Rio // Int. Microbiol. — 2005. — V. 8(3). — P. 195—204.
3. Wong, D.W. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2009. — V. 157(2). — P. 174—209.
4. Rodriguez, C.S. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review / C.S. Rodriguez, J.L.T. Herrera // Biotechnol. Adv. — 2006. — V. 24(5). — P. 500—513.
5. Kunamneni, A. Laccases and their applications: A patent review / A. Kunamneni, F.J. Plou, A. Ballesteros, M. Alcalde // Recent Pat. Biotechnol. — 2008. — V. 2(1). — P. 10—24.
6. Collins, P.J. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor* / P.J. Collins, A.D.W. Dobson // Appl. Environ. Microbiol. — 1997. — V. 63. — N. 9. — P. 3444—3450.
7. Moldes, D. Different proportion of laccase isoenzymes production by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes / D. Moldes, M. Lorenzo, M.A. Sanroman // Biotechnol. Letters. — 2004. — V. 26. — P. 327—330.
8. Rogalski, J. Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending of culture conditions / J. Rogalski, T. Lundell, A. Leonowicz, A. Hatakka // Acta Microbiol. Polon. — 1991. — V. 40. — P. 221—234.
9. Schmidt, K.R. Fungal inoculum properties and its effect on growth and enzyme activity of *Trametes versicolor* in soil / K.R. Schmidt, S. Chand, P.A. Gostomski, K.S. Boyd-Wilson, C. Ford, M. Walter // Biotechnol. Prog. — 2005. — V. 21(2). — P. 377—385.
10. Thiruchelvam, A.T. Growth and laccase production kinetics of *Trametes versicolor* in a stirred tank reactor / A.T. Thiruchelvam, J.A. Ramsay // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — V. 74(3). — P. 547—554.
11. Xavier, A.M.R.B. *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry / A.M.R.B. Xavier, A.P.M. Tavares, R. Ferreira, F. Amado // Electron. J. Biotechnol. — 2007. — V. 10(3). — P. 444—451.
12. Белова Н.В. Факторы регуляции лакказной активности у базидиомицетов / Н.В. Белова, Н.В. Псурцева, А.А. Кияшко // Микол. фитопатол. — 2008. — Т. 42(6). — С. 1—12.
13. Bourbonnais, R. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization / R. Bourbonnais, M.G. Paice, I.D. Reid, P. Lantier, M. Yaguchi // Appl. Environ. Microbiol. — 1995. — V. 61(5). — P. 1876—1880.
14. Han, M.J. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor* / M.J. Han, H.T. Choi, H.G. Song // J. Microbiol. — 2005. — V. 43(6). — P. 555—560.
15. Xiao, Y.Z. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2 / Y.Z. Xiao, X.M. Tu, J. Wang, M. Zhang, Q. Cheng, W.Y. Zeng, Y.Y. Shi // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2003. — V. 60(6). — P. 700—707.
16. Cho, N.-S. Effect of various compounds on the activity of laccases from *Basidiomycetes* and their oxidative and demethoxylating activities / N.-S. Cho, D.-H. Kim, H.-Y. Cho, S. Ohga, A. Leonowicz // J. Fac. Agr. — 2006. — V. 51(2): — P. 211—218.
17. Stalpers, J.A. Identification of wood-inhabiting fungi in pure culture // Studies in Mycology. — 1978. — V. 16. — P. 248.
18. Черкашин Е.А. Сравнительный анализ последовательностей генов трех высоко редокс-потенциальных лакказ из базидиомицетов / Е.А. Черкашин, Е.В. Степанова, Е.О. Ландесман, О.В. Королева, В.И. Тишков // ДАН. — 2007. — Т. 417. — С. 348—351.
19. Непрысов А.Н. Практикум по микробиологии. — М.: Академия, 2005. — С. 283.
20. Stapleton, P.C. Carbon repression of cellobiose dehydrogenase production in the white rot fungus *Trametes versicolor* is mediated at the level of gene transcription / P.C. Stapleton, A.D. Dobson // FEMS Microbiol. Lett. — 2003. — V. 221. — P. 167—172.
21. Livak, K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // Methods. — 2001. — V. 25(4). — P. 402—408.
22. Haugen, P. The evolution of homing endonuclease genes and group I introns in nuclear rDNA / P. Haugen, V. Reeb, F. Lut-

- zoni, D. Bhattacharya // *Mol. Biol. Evol.* — 2004. — V. 21(1). — P. 129—140.
23. Nobles, M.K. Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes // *Can. J. Bot.* — 1965. — V. 43. — P. 1097—1139.
24. Pezzella, C. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members / C. Pezzella, F. Autore, P. Giardina, A. Piscitelli, G. Sanna, V. Faraco // *Curr. Genet.* — 2009. — V. 55(1). — P. 45—57.
25. Jonsson, L. Characterization of a laccase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor* and structural features of basidiomycete laccases / L. Jonsson, K. Sjöström, I. Haggström, P.O. Nyman // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1995. — V. 1251(2). — P. 210—215.
26. Ong, E. Cloning and sequence analysis of two laccase complementary DNAs from the ligninolytic basidiomycete *Trametes versicolor* / E. Ong, W.B. Pollock, M. Smith // *Gene.* — 1997. — V. 196(1—2). — P. 113—119.
27. Koschorreck, K. Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C-C coupling and oxidation of PAHs / K. Koschorreck, S.M. Richter, A. Swierczek, U. Beifuss, R.D. Schmid, V.B. Urlacher // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2008. — V. 474(1). — P. 213—219.
28. Jing, D. Optimization of laccase production from *Trametes versicolor* by solid fermentation / D. Jing, P. Li, F. Stagnitti, X. Xiong // *Can. J. Microbiol.* — 2007. — V. 53(2). — P. 245—251.
29. Arrockiasamy, S. Enhanced production of laccase from *Coriolus versicolor* NCIM 996 by nutrient optimization using response surface methodology / S. Arrockiasamy, I.P.G. Krishnan, N. Anandakrishnan, S. Seenivasan, A. Sambath, J.P. Venkatasubramani // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2008. — V. 151. — P. 371—379.
30. Bollard, J. Comparative studies of extracellular fungal laccases / J. Bollard, A. Leonowicz // *Appl. Env. Microbiol.* — 1984. — V. 48. — P. 849—854.
31. Шутова В.В. Влияние ионов меди на синтез лакказы грибом *Lentinus (Panus) tigrinus* / В.В. Шутова, В.В. Ревин, Ю.А. Мякушина // *Прикл. биохим. микробиол.* — 2008. — № 6. — С. 683—687.
32. Malarczyk, E. Effect of low doses of guaiacol and ethanol on enzymatic activity of fungal cultures / E. Malarczyk, A. Jarsz-Wilkolazka, J. Kochmanska-Rdest // *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.* — 2003. — V. 1(2). — P. 167—178.
33. Jang, M.Y. Enhanced production of laccase from *Trametes sp.* by combination of various inducers / M.Y. Jang, W.Y. Ryu, M.H. Cho // *Biotechnol. Biopr.* — 2006. — V. 11. — P. 96—99.
34. Uldschmid, A. Identification and functional expression of ctaA, a P-type ATPase gene involved in copper trafficking in *Trametes versicolor* / A. Uldschmid, R. Dombi, K. Marbach // *Microbiology.* — 2003. — V. 149(Pt 8). — P. 2039—2048.

N.V. SHAKHOVA¹, S.A. GOLENKINA², E.V. STEPANOVA², D.S. LOGINOV², N.V. PSURTSEVA¹, T.V. FEDOROVA², and O.V. KOROLEVA^{2,*}

¹ The Komarov Botanical Institute, Russ. Acad. Sci., 197376, St.-Petersburg Russia

² The Bach Institute of Biochemistry, Russ. Acad. Sci., 119071, Moscow Russia

e-mail: koroleva@inbi.ras.ru

Effect of Submerged Culturing Conditions and Inducers on Production of Extracellular Laccase by a *Trametes versicolor* 1666 Strain

The phylogenetic position of basidiomycete *Trametes versicolor* 1666 from the Komarov Botanical Institute (LEBIN) Collection has been verified by genetic analysis that also revealed the presence of a single laccase gene. The study of cultivation dynamics showed a low level of laccase, peroxidase and Mn-peroxidase production on either glucose-peptone or synthetic medium. The level of laccase activity in CL remained practically unchanged during cultivation on a medium optimized by multifactorial experiment in comparison with the standard medium. The introduction of laccase inducers (syringaldazine, caffeic acid and sinapic acid) provided no effect on enzyme activity in the culture liquid. The level of laccase gene transcription remained unaffected by the addition of copper to the optimum culture medium, as was confirmed by a real-time PCR. The transcription behavior of the laccase gene and occurrence of the enzymatic activity in culture liquid during *T. versicolor* 1666 cultivation testify to the enzyme constitutive synthesis and the existence of additional regulatory pathways in the laccase gene expression.

Key words: basidiomycete, enzyme induction, gene, identification, laccase, laccase mRNA transcripts, multifactorial experiment, peroxidase.

* Author for correspondence.