

Biotransformacja daunomycyny przez anamorficzny szczep *Bjerkandera adusta* CCBAS 930 (wyniki badań wstępnych)

Rybczyńska-Tkaczyk K., Kornilowicz-Kowalska T.,

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, Pracownia Mikologiczna, ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin

Wstęp

W ostatnich latach wzrasta produkcja i zużycie leków przeciwnowotworowych a tym samym zawartość tych farmaceutyków lub ich metabolitów w ściekach. Ze względu na fakt, że nowoczesne cytostatyki wykazują wysoką odpornością na czynniki środowiska, właściwości kancerogenne, mutagenne oraz teratogenne, ścieki zawierające te substancje stanowią duże zagrożenie dla środowiska wodnego. Zwiększona trwałość farmaceutyków utrudnia ich całkowitą degradację podczas procesów oczyszczania ścieków oraz przyczynia się do ich akumulacji w środowisku. Pozostałości tych leków mogą przedostawać się do wód powierzchniowych oraz podziemnych co zagraża zarówno organizmom wodnym jak i zdrowiu człowieka. W ostatnich latach znaczenie zyskują biologiczne metody usuwania zanieczyszczeń z wykorzystaniem mikroorganizmów, które stanowią alternatywę lub uzupełnienie dotychczas stosowanych konwencjonalnych metod fizykochemicznych. Obiecujące pod tym względem są szczególnie tzw. grzyby białej zgnilizny drewna (*Basidiomycetes*).

Cel pracy

Celem niniejszej, wstępnej pracy było określenie kierunku biotransformacji daunomycyny przez anamorficzne stadium podstawczaka białej zgnilizny drewna *Bjerkandera adusta* CCBAS 930.

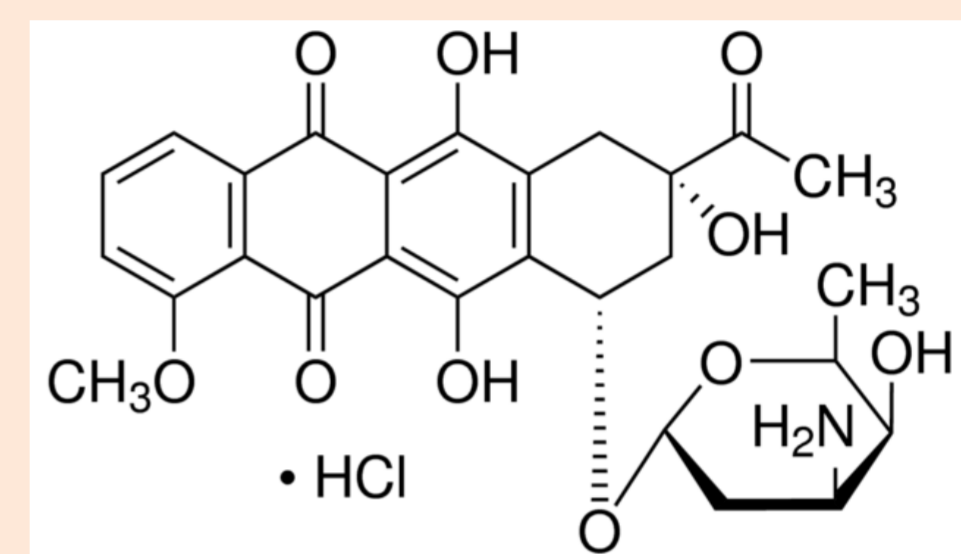
Materiał i metody

Szczep grzyba

W badaniach wykorzystano anamorficzny stadium podstawczaka białej zgnilizny drewna *B. adusta* CCBAS 930 wyizolowane z czarnej ziemi (Pheozems, FAO) (Kornilowicz-Kowalska i in. 2006).

Daunomycyna

Daunomycyna jest antybiotykiem antracyklinowym I generacji zawierającym trzy pierścienie aromatyczne, w tym dwa o charakterze hydrochinonu oraz jedną grupę metoksyłową (Rys.1). Wchodzi w skład grzybni odpadowej oraz odcieków po-produkcyjnych z hodowli *Streptomyces peucetius* – promieniowca wykorzystywanego w produkcji tego leku przez przemysł farmaceutyczny. Po modyfikacji wykorzystywana jest w leczeniu chorób nowotworowych.



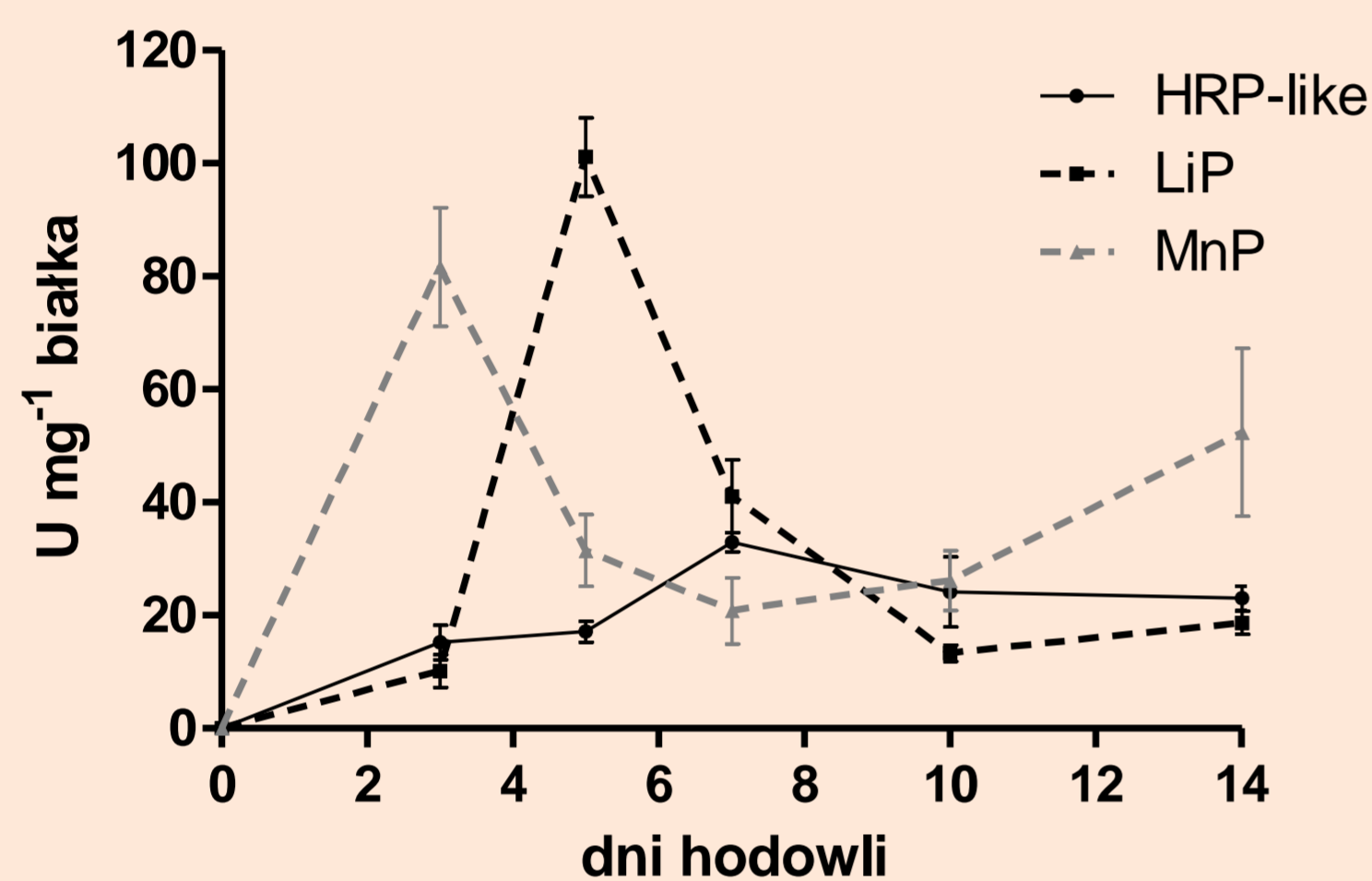
Rys. 1. Struktura chemiczna daunomycyny

Warunki hodowli

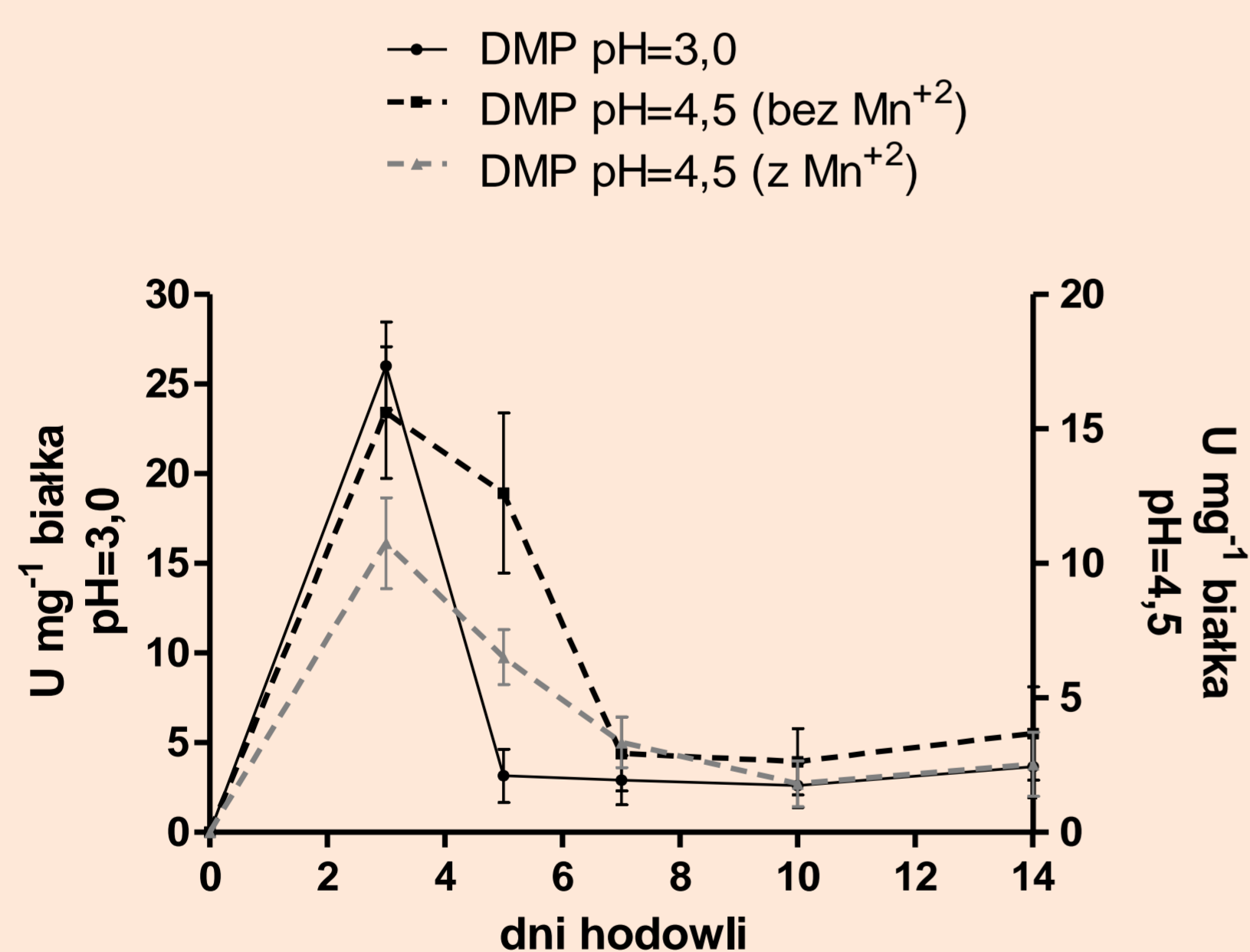
Ocenę aktywności dekoloryzacyjnej szczepu *B. adusta* CCBAS 930 badano w warunkach statycznych (14 dni, 26°C) stosując 50ml płynnego podłoża mineralnego wzbogaconego 0,25% glukozą z dodatkiem daunomycyny (10 µg/ml). Inokulum stanowił 1ml (10⁵ j.t.k ml⁻¹) homogenizowanej grzybni *B. adusta* CCBAS otrzymany z płynnej 7-o dniowej hodowli na podłożu maltzowym.

Analizy biochemiczne

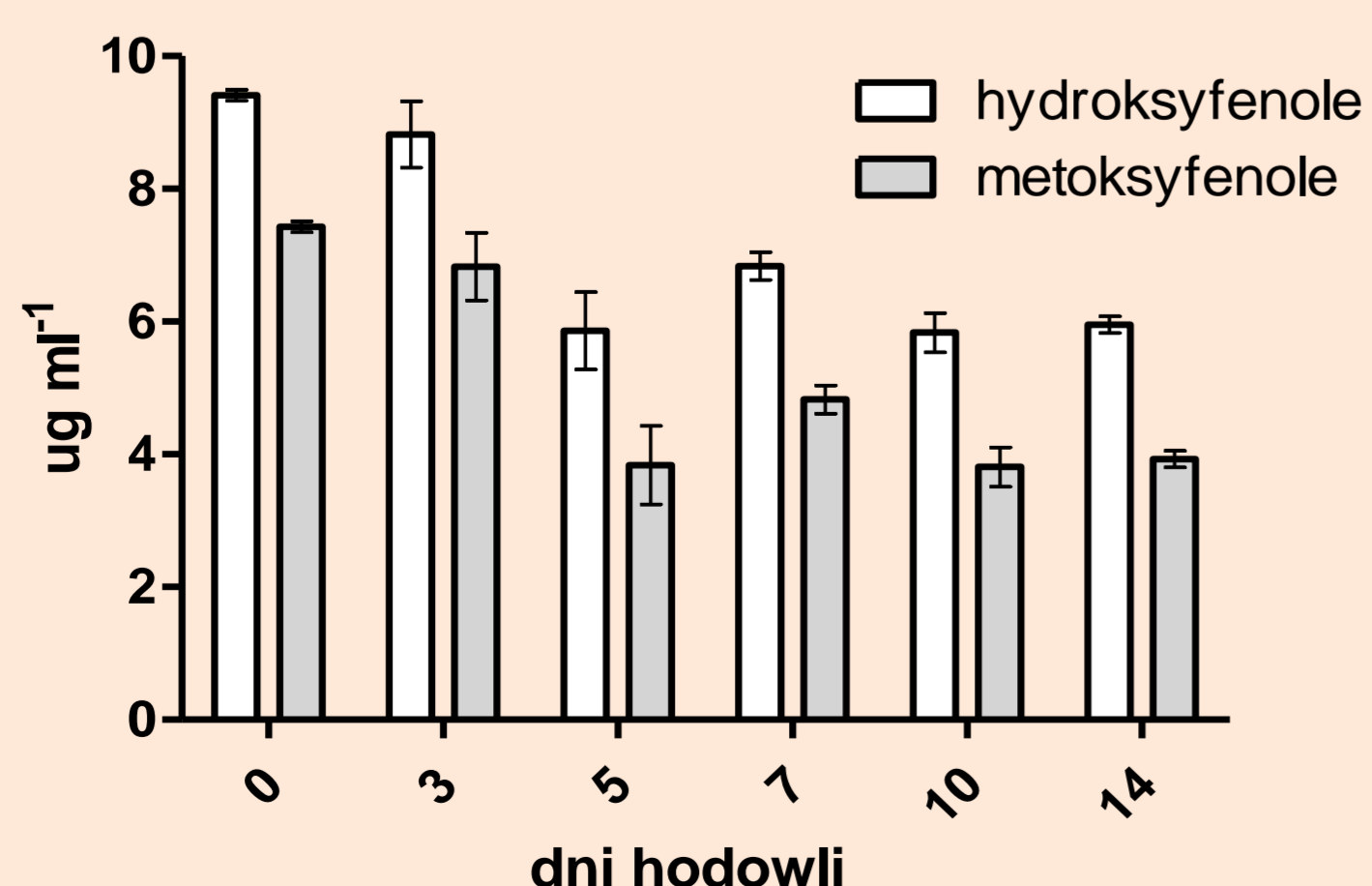
W klarownych płynach pochodzących okresowo oznaczano stopień dekoloryzacji (%) daunomycyny (A_{480nm}), zawartość białka, poziom związków hydroksyl- i metoksyfenolowych oraz aktywność peroksydaz: podobnej do chrzanowej (HRP-like), ligninazy (LiP), manganozależnej (MnP) oraz uniwersalnej (VP). W celu odzyskania zaabsorbowanych substancji barwnych, po zakończeniu doświadczenia grzybnię przenoszono do kolbek Erlenmeyera zawierających 50cm³ 70% etanolu i wytrząsano (150rpm/min).



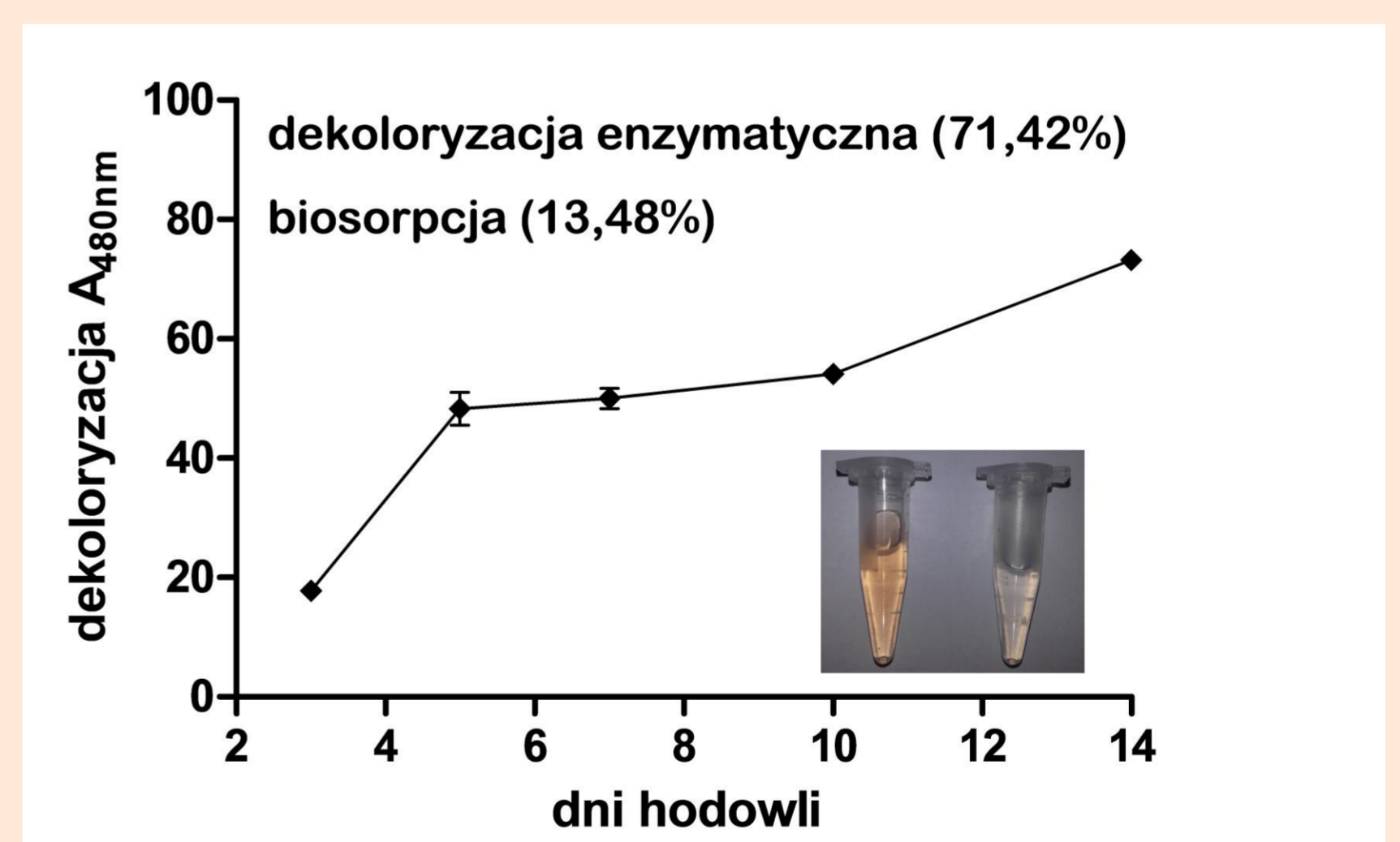
Rys.3. Aktywność zewnątrzkomórkowych peroksydaz w hodowlach *B. adusta* CCBAS 930 z dodatkiem daunomycyny (10µg/ml)



Rys.4. Aktywność zewnątrzkomórkowej peroksydazy uniwersalnej (VP) wobec 2,6 -dimetoksyfenolu (DMP) w zależności od pH oraz dodatku jonów Mn²⁺



Rys. 5. Zawartość związków fenolowych w hodowlach szczepu *B. adusta* CCBAS 930 z dodatkiem daunomycyny (10µg/ml)



Rys. 2. Biotransformacja daunomycyny (10µg/ml) w stacjonarnych hodowlach płynnych szczepu *B. adusta* CCBAS 930

Ważniejsze wyniki i wnioski:

- W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że anamorficzny szczep podstawczaka białej zgnilizny drewna *B. adusta* CCBAS 930 usuwa daunomycynę zarówno na drodze dekoloryzacji enzymatycznej jak i biosorpcji (Rys.2)
- W hodowlach *B. adusta* CCBAS 930 z dodatkiem daunomycyny stwierdzono aktywność peroksydaz: HRP-like, LiP, MnP oraz VP (Rys.3,4)
- Biotransformacja daunomycyny w hodowlach szczepu *B. adusta* CCBAS 930 była skorelowana z obniżeniem zawartości związków fenolowych ($r=-0,85$) i metoksyfenolowych ($r=-0,87$) oraz wzrostem aktywności peroksydazy HRP-like ($r=0,47$) (Rys.3,5)
- Najwyższe aktywności peroksydazy MnP oraz VP stwierdzono w pierwszym tygodniu hodowli *B. adusta* CCBAS 930 z dodatkiem daunomycyny (Rys.3,4)