УДК 577.151+577.152.18

Е. А. Флюрик, ассистент (БГТУ); В. Н. Леонтьев, доцент (БГТУ);
В. В. Кононович, студентка (БГТУ)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБА *TRICHODERMA VIRIDE* Ф-84 – ПРОДУЦЕНТА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ТИОЛОКСИДАЗЫ

Статья посвящена изучению влияния физико-химических факторов среды – концентрации индуктора, температуры, уровня аэрации и времени культивирования мицелиального гриба *T. viride* Ф-84 – на продукцию внеклеточной тиолоксидазы в лабораторных условиях. Оптимальные условий культивирования мицелиального гриба определяли с использованием метода Рехтшафнера при $n \geq 4$, представляющего собой разновидность несимметричных насыщенных планов.

The article covers the influence of physico-chemical environment factors – the concentration of inducer, the temperature, the level of aeration and the time of cultivation of filamentous fungi *T. viride* F-84 on the production of extracellular thioloxidase in the laboratory conditions. Optimal conditions for the cultivation of filamentous fungi was determined using the Rehtshafner method with $n \geq 4$, representing a variety of asymmetric saturated plans.

Введение. Грибы рода *Trichoderma* широко распространены в окружающей среде: почве, воде, торфе, на растительных остатках и других материалах, содержащих целлюлозу. В природе встречается в основном в конидиальной стадии. Колонии гриба имеют зеленоватую, сине-, голубовато-, изумрудно- и темно-зеленую окраску с белым опущенным краем. *Trichoderma* относится к мезофилам с оптимальной температурой роста 25–35°С. Колонии гриба растут быстро, достигая 9,0 см в диаметре за 4 дня при температуре 20°С, за 3 дня при температуре 25°С. Оптимальным для питательной среды является интервал pH от 4,5 до 6,0. При pH выше 7,0 рост гриба замедляется [1].

Грибы рода *Trichoderma* известны как активные продуценты разнообразных ферментов ксиланазы, целлюлазы, пектиназы, которые успешно применяются в различных отраслях промышленности. В коллекции микроорганизмов кафедры биотехнологии и биоэкологии имеется штамм *Trichoderma viride* Ф-84, который является продуцентом внеклеточной тиолоксидазы (КФ 1.8.3.2 тиол : кислородоксидоредуктаза). Данный штамм был выделен из образцов почв газораспределительной станции, загрязненных меркаптанами. Ранее установили, что внеклеточная тиолоксидаза мицелиального гриба *T. viride* Ф-84 является индуцибельным ферментом и индуктором биосинтеза выступает β-меркаптэтанол [2].

Фермент тиолоксидаза, согласно классификации, разработанной комиссией Международного биохимического союза, относится к классу оксидоредуктаз, действующих на серосодержащие группы доноров (оксидоредуктаза, КФ 1.8).

Тиолоксидазы являются двухсубстратными ферментами, и в качестве донора электронов и протонов выступает тиол, а в качестве акцептора могут выступать кислород и другие соединения, представленные в табл. 1. В качестве акцептора электронов могут выступать NAD^+ или $NADP^+$, цитохром, кислород, дисульфидные соединения и некоторые другие вещества [3].

Таблица 1

Классификация тиолоксидаз

1	Оксидоредуктазы
1.8	Действуют на серосодержащие группы доноров
1.8.1	Акцептором служит NAD^+ или $NADP^+$
1.8.2	Акцептором служит цитохром
1.8.3	Акцептором служит кислород
1.8.4	Акцептором служит дисульфидное соединение
1.8.5	Акцептором служит хинон или родственное соединение
1.8.7	Акцептором служит железосеропротеид
1.8.99	Используют другие акцепторы

Реакции, катализируемые тиолоксидазой, можно представить в общем виде:

$$4\,R{-}SH + O_2 \longrightarrow 2\,R{-}S{-}S{-}R + 2\,H_2O_2,$$

$$R{-}SH + O_2 \longrightarrow R{-}S{-}S{-}R + H_2O_2.$$

Тиолоксидазы могут быть как внутриклеточными, так и внеклеточными. Наибольшее значение имеют микроорганизмы, продуцирующие внеклеточные ферменты, т. к. процесс выделения внутриклеточных ферментов значительно сложнее.

Внеклеточная тиолоксидаза, осуществляющая окисление сульфгидрильных групп, обнаружена у целого ряда грибов и дрожжей, например, у мицелиального гриба *Penicillium sp.* К-6-5 [4]. Тиолокисляющий фермент, выделенный из мицелиального гриба *Aspergillus niger* [5], обладал способностью окислять восстановленный глутатион с поглощением молекулярного кислорода и образованием перекиси водорода. Необходимо

отметить, что в грибах *Piricularia oryzae* и *Piricularia versicolor* также был обнаружен фермент, обладающий тиолоксидазной функцией, он катализирует реакции окисления тиофенола, тиоацетата, диэтилдитиокарбамата натрия в дисульфидные формы [6]. При скрининге альтернативных путей окисления у *Saccharomyces cerevisiae*, авторы [7] обнаружили флавопротеин, обладающий тиолоксидазной функцией. Данный фермент катализирует O_2-зависимый процесс образования дисульфидных связей в белках. Кроме того, тиолоксидазная активность обнаружена у таких ферментов, как – пероксидаза [8] и Cu, Zn-супероксид-дисмутаза [9].

Способность тиолоксидаз окислять сульфгидрильные группы нашла применение при разработке метода дезодорации меркаптанов – высокотоксичных веществ, имеющих неприятный запах. Меркаптаны широко используются для одоризации природного газа, который не имеет цвета и запаха. Для дезодорации обьектов, загрязненных меркаптанами, на кафедре биотехнологии и биоэкологии был разработан ферментный препарат ТУ РБ 101478806.001-2004 «Препарат ферментный «АНТИ-ОДОР». Препарат создан на основе штамма мицелиального гриба *T. viride* Ф-84, который хранится в коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии.

Целью настоящей работы было изучение влияния физико-химических факторов среды (концентрации индуктора, температуры, уровня аэрации и времени культивирования мицелиального гриба *T. viride* Ф-84) на биосинтез внеклеточной тиолоксидазы в лабораторных условиях.

Основная часть. Для определения оптимальных условий культивирования применяются разнообразные математические методы, например метод Эйлера, Рунге-Кутта, метод прогноза-коррекции Адамса-Бемфорса-Маултона, метод Рехтшафнера и др.

Для определения оптимальных условий культивирования мицелиального гриба *T. viride* Ф-84 использовали метод Рехтшафнера при $n \geq 4$, представляющий собой разновидность несимметричных насыщенных планов. Спектр подобных планов получается при извлечении k строк из матрицы спектра ПФЭ (полный факторный эксперимент) 3^n в соответствии с определенными правилами [10].

В качестве центра плана использовали оптимальные значения по четырем критериям: концентрация индуктора, pH питательной среды, уровень аэрации и время культивирования, при которых достигается максимальный биосинтез внеклеточной тиолоксидазы штаммом *T. viride* Ф-84.

Область действия определили исходя из выражения:

$$X_i^0 - \Delta X_i \geq X_i \leq X_i^0 + \Delta X_i,\ I = 1, 2, \ldots, n.$$

Значение ΔX выбирали для каждого критерия, оно зависит от величины оптимума (табл. 2).

Таблица 2

Критерии насыщенного плана Рехтшафнера при $n \geq 4$

Значение	Концентрация индуктора (X_1), об. %	pH питательной среды (X_2)	Аэрация воздухом (X_3), м^3/м^3 питательной среды в 1 ч	Время культивирования (X_4), сут
–1	0,05	4,6	0,5	1
0	0,20	5,1	1,0	5
1	0,35	5,6	1,5	9

В табл. 3 приведены значения критериев в соответствии с насыщенным планом Рехтшафнера.

Таблица 3

Распределение критериев в соответствии с насыщенным планом Рехтшафнера

Номер опыта	X_1	X_2	X_3	X_4
1	0,05	4,6	0,5	1
2	0,05	5,6	1,5	9
3	0,35	4,6	1,5	9
4	0,35	5,6	0,5	9
5	0,35	5,6	1,5	1
6	0,35	5,1	1,0	5
7	0,20	5,6	1,0	5
8	0,20	5,1	1,5	5
9	0,20	5,1	1,0	9
10	0,35	5,6	0,5	1
11	0,35	4,6	1,5	1
12	0,35	4,6	0,5	9
13	0,05	5,6	1,5	1
14	0,05	5,6	0,5	9
15	0,05	4,6	1,5	9

В соответствии с данными, приведенными в табл. 3, проводили культивирование мицелиального гриба *T. viride* Ф-84. Культивирование гриба осуществляли на установке Environmental Shaker-Incubator ES-20 («BioSan», Латвия) в сусло-бульоне (6–8°Б).

Из качалочных колб отбирали аликвоты культуральной жидкости (КЖ) по 2,0 мл, центрифугировали их на центрифуге MPW-310 15 мин при 5600×g и затем подвергали гельхроматографированию. На колонку 1,2×90 см, заполненную гелем TOYOPEARL HW-55 (Toyosoda, Япония), вносили 1,0 мл супернатанта и элюировали уравновешивающим

0,1 М Na-фосфатным буферным раствором (pH 7,0). Определение активности внеклеточной тиолоксидазы в КЖ осуществляли полярографическим методом на полярографе POLAROGRAPHIC ANALYZER PA2 (Чехословакия) с применением электрода Кларка. Данный метод основан на определении скорости потребления кислорода при окислении β-меркаптоэтанола в жидкой среде.

На рис. 1 и 2 представлены примеры профилей элюирования внеклеточных белков КЖ *T. viride* Ф-84, полученные с помощью гель-хроматографии при разных условиях культивирования.

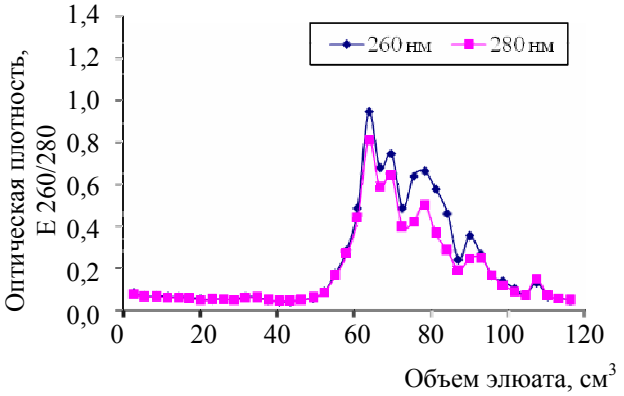

Рис. 1. Профили элюирования внеклеточных белков культуральной жидкости мицелиального гриба *T. viride* Ф-84 (опыт № 1). Условия: концентрация индуктора 0,05 об. %; pH питательной среды 4,6; время культивирования 1 сут; питательная среда – сусло-бульон; уровень аэрация 0,5 м^3/м^3

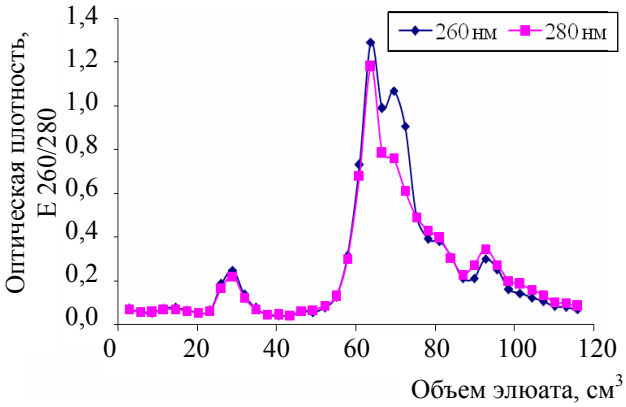

Рис. 2. Профили элюирования внеклеточных белков культуральной жидкости гриба *T. viride* Ф-84 (опыт № 7). Условия: концентрация индуктора 0,2 об. %; pH питательной среды 5,6; время культивирования 5 сут; питательная среда – сусло-бульон; уровень аэрация 1,0 м^3/м^3

Заключение. В качестве критериев, объективно отражающих эффективность биосинтеза фермента, выбрали определение удельного содержания фермента в КЖ и его активности, которые определяли с помощью методов гель-хроматографии и полярографии. Установили, что наивысшая продукция фермента грибом *T. viride* Ф-84 достигается при следующих параметрах культивирования: концентрация индуктора 0,20 об. %; pH питательной среды 5,6; время культивирования 5 сут; уровень аэрация 1,0 м^3/м^3; питательная среда – сусло-бульон.

Литература

1. Samuels, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus / G. J. Samuels // Mycological Research. – 1996. – Vol. 100, № 8. – P. 923–935.

2. Флюрик, Е. А. Индукция биосинтеза внеклеточного фермента тиолоксидаза микроорганизмами / Е. А. Флюрик, В. Н. Леонтьев // Труды БГТУ. Сер. IV, Химия и технология орган. в-в. – 2008. – Вып. XIV. – С. 177–180.

3. Диксон, М. Классификация ферментов / М. Диксон, Э. Уэбб // Ферменты: в 3 т. / М. Диксон, Э. Уэбб; под ред. В. К. Антонова, А. Е. Браунштейна; пер. с англ. Л. М. Гинодмана, М. И. Левят. – М., 1982. – Т. 1. – Гл. 5. – С. 291–329.

4. Kusakabe, H. Purification and properties of a new enzyme, glutathione oxidase from *Penicillium sp*. K-6-5 / H. Kusakabe, A. Kuninaka, H. Yoshino // Agr. and Biol. Chemistry. – 1982. – Vol. 46, № 8. – P. 2057–2067.

5. De la Motte, R. S. *Aspergillus niger* sulfhydryl oxidase / R. S. De la Motte, F. W. Wagner // Biochemistry. – 1987. – Vol. 26. – P. 7363–7371.

6. Thiooxidase, a new sulfhydryl-oxidizing enzyme from piricularia oryzae and polyporus versicolor / H. A. Neufeld [et al.] // The J. of Biol. Chemistry. – 1958. – Vol. 232, № 2. – P. 1093–1099.

7. A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation / C. S. Sevier [et al.] // Nature cell biology. – 2001. – Vol. 3, № 9. – P. 874–882.

8. Characterization of sheep lacrimal-gland peroxidase and its major physiological electron donor / A. Mazumdar [et al.] // Biochem. J. – 1996. – Vol. 314. – P. 413–419.

9. Thiol oxidase activity of copper, zinc superoxide dismutase stimulates bicarbonate-dependent peroxidase activity via formation of a carbonate radical / C. Karunakaran [et al.] // Chem. Research in Toxicology. – 2005. – Vol. 18, № 3. – P. 494–500.

10. Красовский, Г. И. Планирование эксперимента / Г. И. Красовский, Г. Ф. Филаретов. – Минск: Изд-во БГУ, 1982. – 302 с.

Поступила 26.03.2010