

## ИНДУКЦИЯ БИОСИНТЕЗА ВНЕКЛЕТОЧНОГО ФЕРМЕНТА ТИОЛОКСИДАЗА МИКРООРГАНИЗМАМИ

Paper is devoted to studying of an induction of a biosynthesis of an extracellular thioloxidase by mycelium strain *Trichoderma viride* F-84. Strain is isolated from the specimen of soil of the gas-distribution station polluted by mercaptans. The algorithm of the research of a biosynthesis of ferment is presented. The growth of this strain on synthetic and natural medium at superficial and deep-seated methods of cultivation is studied. In this article the profiles of elution of the proteins of cultural liquid, obtained at different methods of cultivations. It is positioned, that the extracellular thiol oxidase is inducible ferment. It is shown, that mercaptans act as an inductor of a biosynthesis of a thiol oxidase. By means of gel permeation chromatography molecular weight of an extracellular thiol oxidase of strain *Trichoderma viride* F-84 is determined.

**Введение.** В настоящее время все большее распространение получают биологически активные вещества микробного происхождения. Они находят применение в промышленных и сельскохозяйственных процессах, производстве продуктов бытовой химии и т. д. Это связано с высокой скоростью роста микроорганизмов, легкостью контроля условий культивирования и возможностью достичь высокого уровня биосинтеза целевых продуктов.

Одними из наиболее важных веществ биосинтеза являются внеклеточные ферменты, которые микроорганизмы выделяют в культуральную жидкость в процессе культивирования. С точки зрения технологического процесса в производстве наиболее целесообразно использовать продуценты внеклеточных ферментов, так как процесс выделения внутриклеточных ферментов значительно сложнее.

Все ферменты можно разделить на конститутивные и индуцибельные.

Индукцибельные ферменты синтезируются клетками только в ответ на присутствие в среде субстрата-индуктора. Он взаимодействует с репрессором, инактивирует его, в результате чего включается генетический аппарат клетки и начинается синтез соответствующего фермента. К индуцибельным относится большинство гидролитических ферментов, а также ферменты класса оксидоредуктаз, например нитратредуктазы (NADH или NADPH: нитрат оксидоредуктазы), катализирующие восстановление нитратов в нитриты [1]. Широко распространены такие ферменты у микроорганизмов, грибов, водорослей и высших растений.

Индукторами биосинтеза являются многие питательные вещества. Например, в качестве индуктора могут выступать меркаптаны.

Установлено, что окисление меркаптанов осуществляет внеклеточный фермент тиолоксидаза [2], однако в настоящее время в литературе отсутствуют данные о том, конститутивный это фермент или индуцибельный.

Фермент тиолоксидаза (оксидоредуктаза, КФ 1.8.3.2) является двухсубстратным фермен-

том, в качестве донора электронов и протонов выступают соединения с сульфгидрильной функциональной группой, а акцептором могут являться кислород и другие соединения, например NAD<sup>+</sup> (NADP<sup>+</sup>) или цитохром [3].

Учитывая вышеизложенное, а также тот факт, что этилмеркаптан широко используется для одоризации природного газа и существует необходимость его деградации, целью настоящей работы явилось выявление особенностей биосинтеза внеклеточной тиолоксидазы мицелиальным грибом *Trichoderma viride* Ф-84, выделенным из образца почвы газораспределительной станции.

**Основная часть.** В работе использовали: агар-агар бактериологический, КН<sub>2</sub>Р<sub>4</sub>, глюкозу, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, Н<sub>3</sub>Р<sub>4</sub>, К<sub>2</sub>НР<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Са(НО<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (все квалификации х. ч., ЗАО «Пять океанов», Беларусь), кумасси бриллиантовый голубой G-250 (Coomassie brilliant blue G-250) производства «Sigma» (США), пивное неохмеленное сусло (ОАО «Оливария», Беларусь), β-меркаптоэтанол производства «Aldrich» (США).

Синтетическая среда Ридер для культивирования мицелиального штамма: 20 см<sup>3</sup> солевого концентрата Ридер (4×), 5 см<sup>3</sup> глюкозы (20% об.) или 1,0 % об. глюкозы, 0,2% об. β-меркаптоэтанола и 25 см<sup>3</sup> стерильной дистиллированной воды.

Для приготовления 1 дм<sup>3</sup> солевого концентрата Ридер (4×) необходимо: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 12,0 г, MgSO<sub>4</sub> – 2,8 г, NaCl – 2,0 г, Са(НО<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – 1,6 г, КН<sub>2</sub>Р<sub>4</sub> – 4,0 г, К<sub>2</sub>НР<sub>4</sub> – 0,4 г, рН = 4,2–4,5, дистиллированной водой объем довели до 1 дм<sup>3</sup>.

Для первичного поиска продуцентов внеклеточной тиолоксидазы необходимо было установить наличие активности данного фермента у микроорганизмов. Для этого был использован полярографический метод, который позволяет и качественно, и количественно определить наличие фермента [2].

Проведенный скрининг коллекции микроорганизмов кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ, а также штаммов, выделенных

из образцов почвы, загрязненной меркаптанами, и водного затвора емкости хранения меркаптанов по продукции внеклеточного фермента – тиолоксидазы позволил выделить несколько штаммов, обладающих активностью [4]. Из этих штаммов для настоящего исследования был выбран штамм *T. viride* Ф-84 (рис. 1), выделенный из образца почвы газораспределительной станции, так как уровень биосинтеза тиолоксидазы этого штамма значительно превышал аналогичный показатель для других штаммов.



Рис. 1. Мицелиальный гриб *T. viride* Ф-84, выделенный из образца почвы газораспределительной станции

Алгоритм исследования индукции биосинтеза внеклеточной тиолоксидазы мицелиальным грибом *T. viride* Ф-84 представлен на рис. 2.

Молекулярная масса исследуемого внеклеточного фермента, определенная методом гель-фильтрации, равна 12 кДа. Гель-хроматографию осуществляли на колонке 1,2×91 см, заполненной гелем TOYOPEARL HW-55 (Toyosoda, Япония), уравновешенной 0,1 М Na-фосфатным буферным раствором (pH = 7,0). Культуральную жидкость центрифугировали 15 мин при 5600×g на CENTRIFUGE MPW-310 (Польша). На колонку вносили 1 см<sup>3</sup> супернатанта и элюировали уравновешивающим буферным раствором со скоростью 0,21 см<sup>3</sup>/(мин×см<sup>2</sup>). Фракции собирали в коллекторе FRACTION COLLECTOR FCC 61 (Чехословакия) и измеряли их экстинкцию при 260 и 280 нм.

Для подбора оптимальной питательной среды проводили культивирование мицелиального гриба на разных питательных средах, анализировали изменение содержания белков во времени и определяли тиолоксидазную активность белков.

За единицу удельной тиолоксидазной активности принимали способность культуральной жидкости, содержащей 1 мг/см<sup>3</sup> внеклеточного белка, определенного методом Бредфорда [5], превращать за 1 мин при температуре 25°C 1 мкмоль меркаптана в дисульфид.

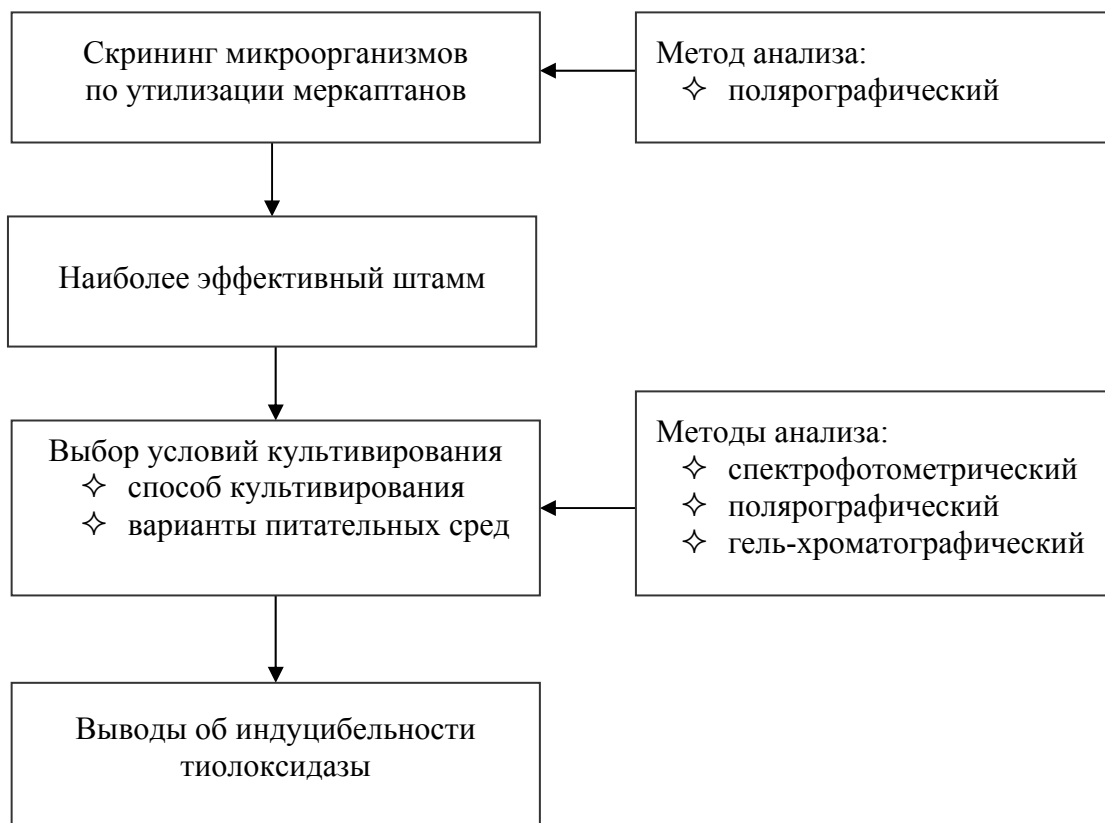


Рис. 2. Алгоритм исследования индукции биосинтеза внеклеточной тиолоксидазы

Мицелиальный гриб *T. viride* Ф-84 инкубировали в колбах Эрленмейера объемом 250 см<sup>3</sup> с 50 см<sup>3</sup> питательной среды Ридер поверхностным и глубинным способами при (30 ± 1)°С. Глубинное культивирование осуществляли на установке Environmental Shaker-Incubator ES-20 («BioSan», Латвия) со скоростью перемешивания 200 мин<sup>-1</sup>.

При культивировании мицелиального гриба на синтетической среде с глюкозой не происходило накопление внеклеточных белков (рис. 3, а).

В случае культивирования на среде с β-меркаптоэтанолом наблюдали накопление в среде внеклеточных белков (рис. 3, б). С помощью полярографического метода установили, что внеклеточная тиолоксидаза локализована во втором хроматографическом пике.

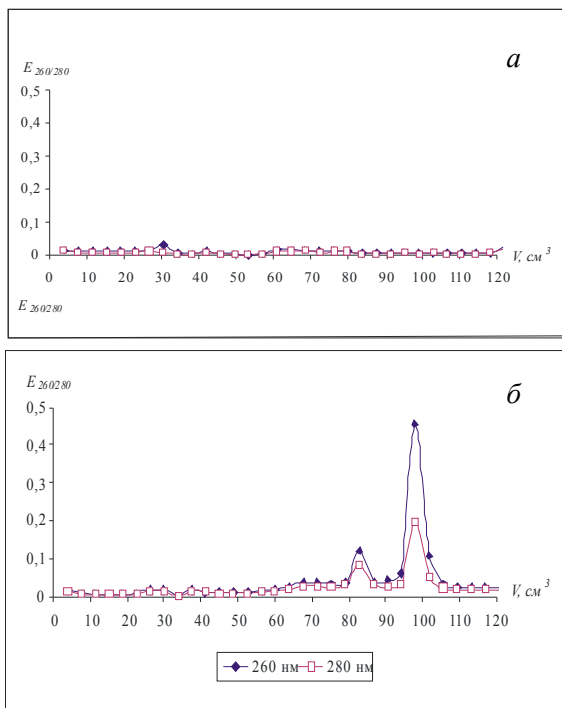


Рис. 3. Профили элюирования белков культуральной жидкости мицелиального гриба *T. viride* Ф-84 (глубинный способ культивирования, синтетическая питательная среда с глюкозой (а), с β-меркаптоэтанолом и глюкозой (б))

Так как на синтетических средах, как правило, выход ферментов невысокий, проводили аналогичные исследования биосинтеза внеклеточного фермента с применением натуральной питательной среды на основе неохмеленного пивного суслу.

На натуральной питательной среде при глубинном способе культивирования также наблюдали биосинтез внеклеточной тиолоксидазы (рис. 4, б) в присутствии β-меркаптоэтанола, без индуктора биосинтез фермента не происходил (рис. 4, а).

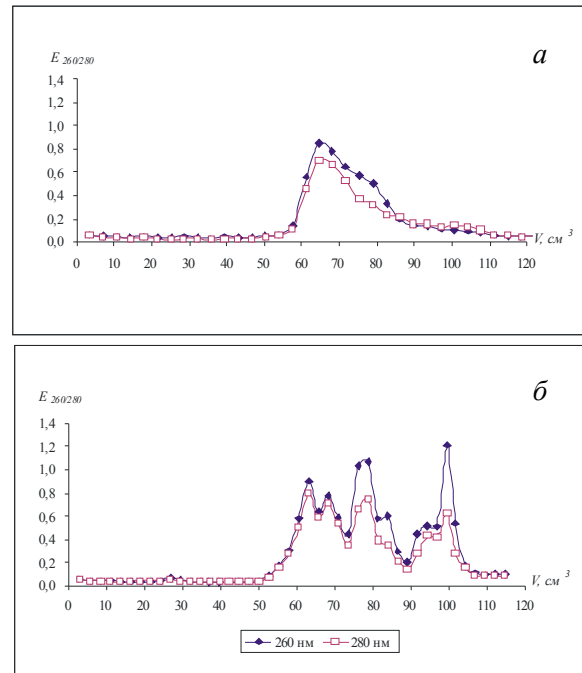


Рис. 4. Профили элюирования белков культуральной жидкости мицелиального гриба *T. viride* Ф-84 (глубинный способ культивирования, натуральная питательная среда без меркаптана (а), с меркаптаном (б))

При выращивании мицелиального гриба на натуральной питательной среде при поверхностном способе культивирования β-меркаптоэтанол также проявлял свойства индуктора (рис. 5).

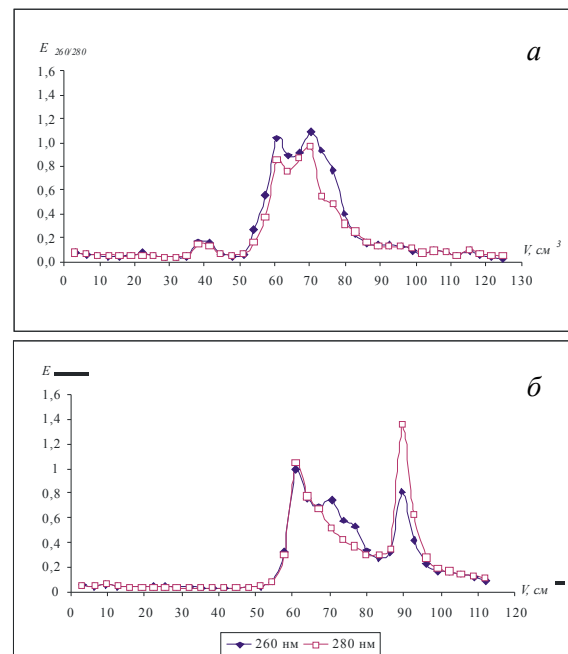


Рис. 5. Профили элюирования белков культуральной жидкости мицелиального гриба *T. viride* Ф-84 (поверхностный способ культивирования, натуральная питательная среда без меркаптана (а), с меркаптаном (б))

Сравние хроматограмм рис. 4 и 5 показало, что при отсутствии индуктора (меркаптана) и при поверхностном, и при глубинном способах культивирования на натуральных питательных средах биосинтез внеклеточной тиолоксидазы не происходил.

На основе отобранного штамма-продуцента внеклеточной тиолоксидазы был создан ферментный препарат, который может быть эффективно использован для дезодорации поверхностей из различных материалов.

**Заключение.** Из проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Внеклеточная тиолоксидаза мицелиального штамма *Trichoderma viride* Ф-84 является индуцибельным ферментом.

2. Индуктором биосинтеза внеклеточной тиолоксидазы являются меркаптаны ( $\beta$ -меркаптоэтанол).

3. Молекулярная масса внеклеточной тиолоксидазы мицелиального штамма *Trichoderma viride* Ф-84 равна 12 кДа.

## Литература

1. Диксон, М. Ферменты: в 3 т. / М. Диксон, Э. Уэбб. – М.: Мир, 1982. – Т. 2. – 515 с.

2. Скрининг тиолоксиляющих микроорганизмов / В. Н. Леонтьев [и др.] // Труды БГТУ. Сер. IV, Химия и технология орган. в-в. – 2004. – Вып. XII. – С. 184–186.

3. Диксон, М. Ферменты: в 3 т. / М. Диксон, Э. Уэбб. – М.: Мир, 1982. – Т. 1. – 392 с.

4. Ферментативная дезодорация меркаптанов / В. Н. Леонтьев [и др.] // ВэйстТэк-2007: доклады 5-го междунар. конгресса по управлению отходами и природными технологиями, М., 29 мая – 1 июня 2007 г. / СИБИКО; редкол.: Н. Ф. Абрамов [и др.]. – М., 2007. – С. 333–334.

5. Практикум по биохимии: учеб. пособие / под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. – 2-е изд. – М.: МГУ, 1989. – 509 с.