

Третьякова О.М., студентка 5 курса факультета биологии и экологии Гродненского государственного университета имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь.

Тихон А.И., студентка 5 курса факультета биологии и экологии Гродненского государственного университета имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь.

Слышенок В.С., доцент кафедры химии и химической технологии Гродненского государственного университета имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь, slysz@tut.by

УДК 577.151+502.55

Е.А. Флюрик, В.Н. Леонтьев

## РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ТИОЛОКСИДАЗЫ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЗАЩИТЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ОТ МЕРКАПТАНОВ

Изучалась кинетика окисления β-меркаптоэтанола внеклеточной тиолоксидазой мицелиального гриба *Trichoderma viride* Ф-84. Штамм выделен из загрязненного меркаптанами образца почвы газораспределительной станции. Представлены результаты определения максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса с помощью полярографического метода.

О значительной роли микроорганизмов в процессах очистки окружающей среды от поллютантов известно давно. Питательными веществами для многих микроорганизмов являются органические соединения, которые не усваиваются высшими организмами. В большинстве случаев эти вещества (углеводороды нефти, метан и др.) являются для таких микроорганизмов необходимыми источниками углерода.

Ранее нами было установлено, что некоторые микроорганизмы способны синтезировать внеклеточную тиолоксидазу – фермент, участвующий в окислении меркаптанов [1].

В результате скрининга микроорганизмов была сформирована коллекция штаммов микроорганизмов, обладающих тиолоксидазной активностью. Среди коллекционных штаммов, для последующей работы, был отобран один, обладающий максимальной тиолоксидазной активностью – штамм мицелиального гриба *Trichoderma viride* Ф-84 [2].

Тиолоксидаза (тиол : кислород оксидоредуктаза, КФ 1.8.3.2) – двухсубстратный фермент, и в качестве донора электронов и протонов выступают соединения с сульфгидрильной функциональной группой, и акцептором могут являться кислород, цитохром с, дисульфидные и другие соединения [3]. Как было установлено [4], внеклеточная тиолоксидаза штамма *T. viride* Ф-84 индуцибельный фермент и индуктором биосинтеза выступают меркаптаны.

В настоящей работе представлены результаты кинетических исследований окисления  $\beta$ -меркаптоэтанола внеклеточной тиолоксидазой мицелиального гриба *T. viride* Ф-84.

Полученные данные статистически обработаны с использованием программы Excel. Достоверность различий между вариантами опыта оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента.

**Объекты и методы исследования.** Объектом исследования был штамм мицелиального гриба *Trichoderma viride* Ф-84, выделенный из образца почвы газораспределительной станции «Пуховичи».

Мицелиальный гриб *T. Virid* Ф-84 инкубировали в колбах Эрленмейера объемом 250 см<sup>3</sup> с 50 см<sup>3</sup> сусле бульона и 0,2 % об.  $\beta$ -меркаптоэтанола, глубинным способом при 30 °С. Культивирование осуществляли на установке Environmental Shaker-Incubator ES-20 («BioSan», Латвия) со скоростью перемешивания 150 мин<sup>-1</sup>. Данные условия позволяют получить максимальный выход внеклеточного фермента.

Культуральную жидкость исследуемого штамма микроорганизмов центрифугировали 15 мин при 5600×g на центрифуге MPW-310 (Польша). Концентрацию внеклеточного белка определяли по методу Бредфорда [5].

Измерение начальной скорости реакции окисления меркаптани кислородом, катализируемой внеклеточной тиолоксидазой грибного штамма, проводили в стандартных условиях (Т = 20 °С, Р = 760 мм рт. ст.). Концентрацию субстрата ( $\beta$ -меркаптоэтанола) изменяли в пределах 0,001×0,29 моль/л.

Кинетические кривые регистрировали на полярографе POLAROGRAPHIC ANALYZER PA2 (Чехословакия) переоборудованном для развертки по времени и снабженном ячейкой с электродом Кларка по методике описанной ранее [2].

Начальные скорости ферментативной реакции рассчитывали как тангенс угла наклона касательных к началу кинетических кривых, полученные значения делили на концентрацию белка. По рассчитанным данным строили зависимость V от C<sub>s</sub>. Для точного определения величин

$V_{\max}$  и  $K_m$  уравнение Михаэлиса–Ментен подвергали преобразованию по Лайнуиверу – Берку [6].

**Результаты и их обсуждение.** Рассчитанные значения  $K_m$  и  $V_{\max}$  представлены в таблице.

Таблица – Результаты кинетических исследований

Концентрация субстрата $C_{ss}$ , ммоль/л	Начальная скорость реакции $V$ , мкмоль/мин·мг <sub>б</sub>	Константа Михаэлиса $K_m$ , ммоль/л	Максимальная скорость реакции $V_{\max}$ , мкмоль/мин·мг <sub>б</sub>
0,01	4,57±0,60	10,00	8,93
0,10	7,47±0,68		
0,15	8,30±0,48		
0,20	9,03±0,42		
0,29	9,23±0,59		

Полученные значения согласуются с результатами, опубликованными в работе [7] и свидетельствуют о высоком сродстве внеклеточной тиолоксидазы штамма *Trichoderma viride* Ф-84 к β-меркаптоэтанолю и низком сродстве к этому субстрату внутриклеточной тиолоксидазы гриба *Aspergillus niger*.

Для оценки вероятности отличий между средними арифметическими начальными скоростями реакции окисления меркаптанов использовали *t*-критерий Стьюдента [8]. Принимали 5 %-й уровень значимости, при этом *t*-критерий равен 4,303.

**Заключение.** Результаты кинетических исследований свидетельствуют о высокой активности внеклеточной тиолоксидазы штамма *Trichoderma viride* Ф-84.

Штамм мицелиального гриба *T. viride* Ф-84, выделенный из образцов загрязненной меркаптанами почвы газораспределительной станции, может быть использован для окисления меркаптанов, являющихся сильными загрязнителями окружающей среды, особенно эти вещества токсичны для водных организмов.

Высокое сродство внеклеточной тиолоксидазы к синтетическому меркаптану позволило создать на базе мицелиального гриба *T. viride* Ф-84 ферментный препарат, предназначенный для дезодорации открытых поверхностей загрязненных соединениями этого ряда. Ферментный препарат нашел применение для решения локальных экологических проблем на газораспределительных станциях.

### Список литературы

1. Флюрик, Е.А. Экзогенная тиолоксидаза в решении проблемы дезодорации меркаптанов / Е.А.Флюрик, В.Н.Леонтьев // Актуальные проблемы экологии – 2007: тез. докл. III Междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 21–23 нояб. 2007 г. / ГрГУ им. Я. Купалы; редкол.: Н. П. Канунникова [и др.]. – Гродно, 2007. – С. 87.
2. Флюрик, Е.А. Тиолоксидазная активность микроорганизмов / Е.А.Флюрик, В.Н. Леонтьев // Доклады НАН Беларуси. – Минск, 2008. (в производстве).
3. Диксон, М. Ферменты: в 3 т. / М.Диксон, Э.Уэбб. – М.: Мир, 1982. – Т. 1.
4. 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. XVI. (в производстве).
5. Дарбре, А. Практическая химия белка / А. Дарбре. – М.: Мир, 1989.
6. Северин, С.Е. Практикум по биохимии: учеб. пособие / С.Е.Северин, Г.А. Соловьева; под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.
7. De la Motte, R.S. Aspergillus niger sulfhydryl oxidase / R.S. De la Motte, F.W. Wagner // Biochemistry. – 1987. – Vol. 26. – P. 7363–7371.
8. Калоша, В.К. Математическая обработка результатов эксперимента / В.К. Калоша, С.И. Лобко, Т.С. Чикова; под ред. В.К. Калоша. – Минск: Выш. школа, 1982.

Paper is devoted to investigation of oxidation of  $\beta$ -mercaptoethanol an extracellular thioloxidase by mycelium strain *Trichoderma viride* F-84. Stain is isolated from the specimen of soil of the gas-distribution station polluted by mercaptans. This article presents the results to determination of maximum speed of reaction and a Michaelis constants means of a polarographic method.

Флюрик Е.А., аспирант кафедры биотехнологии и биоэкологии Белорусского государственного технологического университета, Минск, Беларусь, [Flurike@mail.ru](mailto:Flurike@mail.ru)

Леонтьев В.Н., заведующий кафедрой биотехнологии и биоэкологии Белорусского государственного технологического университета, Минск, Беларусь, [leontiev@bstu.unibel.by](mailto:leontiev@bstu.unibel.by)