

ГЕМИЦЕЛЛЮЛОЗНЫЙ СУБСТРАТ — ИНДУКТОР БИОСИНТЕЗА L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ ТРИХОДЕРМОЙ

И.П. Смирнова¹, Ю.А. Шнейдер², А.А. Шевченко¹

¹Кафедра биохимии

²Кафедра ботаники, физиологии,

патологии растений и агробиотехнологии

Российский университет дружбы народов

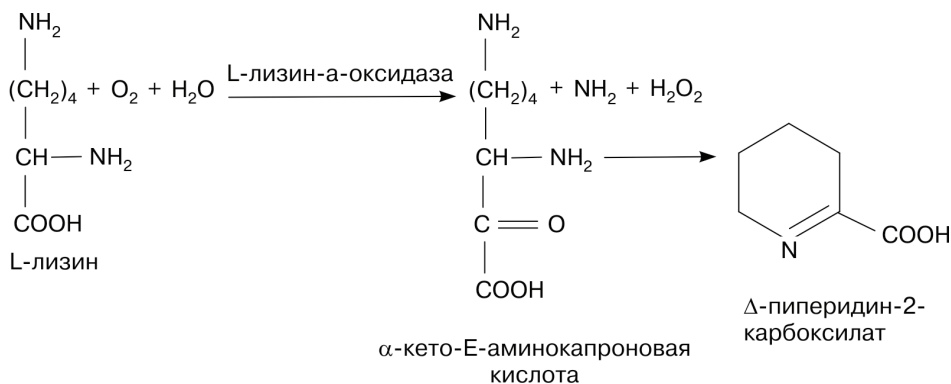
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

Биосинтез фермента L-лизин- α -оксидаза грибом триходермой исследован при различных способах выращивания и на средах с различными источниками углерода. Фермент активно синтезировался только на среде с пшеничными отрубями. Штаммы триходермы при росте на среде с гемицеллюлозным субстратом проявляли разный спектр активностей оксидаз L-аминокислот. С возрастом культуры триходермы спектр аминоксидазных активностей расширялся, но для каждого штамма он оставался индивидуальным.

Ключевые слова: фермент, триходерма, аминоксидазы, биосинтез.

L-лизин- α -оксидаза — метаболит сапрофитного гриба *Trichoderma* — осуществляет реакцию окислительного дезаминирования незаменимой аминокислоты L-лизина.

Реакция деструкции аминокислоты L-лизина протекает следующим образом:



Фермент был получен в Японии из культуральной жидкости гриба *Trichoderma viride*, позднее был получен в России [1—4; 6; 7].

Остаются нерешенными вопросы, связанные с биосинтезом фермента триходермой при разных способах культивирования, использованием различных источников углерода и влиянием метаболита на деструкцию аминокислот, которые являются продуктами распада белков растительного и животного происхождения в почве.

В качестве источника углерода в среде, как было показано ранее японскими исследователями, использовались пшеничные отруби; культивирование продуцента осуществлялось поверхностным способом [1].

Субстрат — пшеничные отруби — содержит следующие биополимеры: белковые вещества (16,9%), пектиновые вещества (3,2%), гемицеллюлозу (23,0%),

целлюлозу (9,6%), крахмал (13,7%). Поскольку биополимеры гемицеллюлоза и целлюлоза представляют собой естественный субстрат для роста триходермы в природных условиях, возникла необходимость выяснить роль пшеничных отрубей как субстрата в образовании фермента грибом триходермой.

В представленной работе исследовались различные варианты сред и возможность замены пшеничных отрубей гемицеллюлозного субстрата на другие источники углерода в связи с образованием фермента, а также субстратная специфичность штаммов рода триходерма при использовании этого субстрата.

Весьма интересным нам представлялось исследование деструкции аминокислот в зависимости от возраста культуры и кислотности среды.

Условия эксперимента. В опытах использовали штаммы рода *Trichoderma*, поскольку активные продуценты L-лизин- α -оксидазы были найдены японскими исследователями среди представителей этого рода [1; 2]:

- 1) *Tr. viride* Rifai,
- 2) *Tr. harzianum* Rifai,
- 3) *Tr. viride Pers ex S.F. Gray*,
- 4) *Tr. longibrachiatum* Rifai,
- 5) *Tr. aureoviride* Rifai.

Посевным материалом служил вегетативный мицелий грибов, выращенный в течение 8—10 суток при температуре 28 °С на среде Чапека. Исследование проводили глубинным способом с использованием лабораторного встряхивателя № 357 («Poland») и поверхностным способом выращивания.

Фоном для изучения L-лизин- α -оксидазной активности гриба служила ранее предложенная среда [1], в состав которой вносились добавки различных источников углерода:

- вариант № 1 содержал крахмал;
- вариант № 2 содержал соевую муку, глюкозу;
- вариант № 3 содержал пшеничные отруби.

Опыты по изучению субстратной специфичности штаммов рода *Trichoderma* проводились при разных значениях pH реакционной смеси с использованием ацетатного буфера pH 5,0 и глицин-HCl буфера pH 8,0.

Активность L-лизин- α -оксидазы в культуральной жидкости *Trichoderma* рассчитывали по приросту H_2O_2 , количество которой определяли спектрофотометрическим ортодиазидиновым микрометодом [3]. Сущность метода заключается во взаимодействии всей образующейся в реакции H_2O_2 с O-дианизидингидрохлоридом. Инкубационная смесь содержала 20 мкг пероксидазы, 250 мкг O-дианизидингидрохлорида и 0,1—0,5 мг белка в 1 мл конечного объема. После 20 мин. инкубирования в термостате при 37 °С пробы охлаждали до 0—4 °С. Оптическую плотность окрашенных растворов опытной и контрольной (без субстрата) проб измеряли на спектрофотометре СФ-16 при 540 нм против второй контрольной пробы (без пероксидазы).

Для построения калибровочной кривой молярность свежеприготовленного раствора H_2O_2 определяли перманганатометрией. Субстратами служили L- и DL-формы аминокислот («Reanal», Венгрия). Применяли 0,05 М фосфатный буфер. В качестве катализатора пероксидазной реакции использовали пероксидазу фирмы

«Reanal», а в качестве донора протонов — О-дианизидингидрохлорид («Мерск», ФРГ). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль H_2O_2 за 1 мин при 37 °С.

Удельную активность фермента выражали числом единиц активности на 1 мг белка или 1 мл культуральной жидкости. Белок определяли по методу Лоури [8]. В качестве стандарта использовали 0,05%-й раствор кристаллического бычьего альбумина («Reanal», Венгрия).

Результаты и обсуждение. На первых стадиях работы изучали биосинтез фермента при различных способах выращивания триходермы: глубинном, стационарном и поверхностном (табл. 1).

Таблица 1

Образование L-лизин- α -оксидазы штаммом № 2 *Trichoderma* sp. при разных способах выращивания на среде с пшеничными отрубями (5-е сутки)

Способ выращивания	pH	Белок, г/мл	Активность, У/мл
Глубинный	6,2	260	1,2
Стационарный	6,7	232	3,3
Поверхностный	6,0	420	4,8

Как видно из табл. 1, наилучший способ выращивания для биосинтеза L-лизин- α -оксидазы грибом триходермой — поверхностный: активность фермента оказалась в 2—3 раза выше, чем при других способах выращивания.

При исследовании образования L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma harzianum* Rifai в динамике на средах с использованием в качестве источника углерода крахмала, соевой муки, глюкозы, пшеничных отрубей при глубинном культивировании нами было выяснено, что на среде с пшеничными отрубями возможно наибольшее образование фермента (табл. 2). На других средах биосинтез фермента оказался весьма незначительным.

Таблица 2

Динамика образования L-лизин- α -оксидазы *Tr. harzianum* Rifai при глубинном культивировании на средах разного состава

Варианты сред*	Сутки роста	pH культуральной жидкости	Белок, г/мл	Активность, У/мл
№ 1	2	6,2	следы	0,3
	3	6,3	следы	0,4
	4	6,5	следы	0,5
	5	6,5	следы	0,5
№ 2	2	5,4	40	0,4
	3	5,7	60	0,5
	4	6,5	56	0,6
	5	6,4	56	0,6
№ 3	2	6,0	108	0,6
	3	6,1	196	0,7
	4	6,4	190	0,7
	5	6,2	260	1,2

* Состав используемых сред указан в условиях эксперимента выше.

Растительные материалы, в том числе и пшеничные отруби, резистентны к действию различных гидролизующих агентов. Это обусловлено их нерастворимостью, высокой степенью кристалличности природной целлюлозы, наличием защитной матрицы, образованной лигнином и гемицеллюлозой, в которую погружены целлюлозные волокна.

Поры лигнифицированных тканей растений малы для прохождения ферментов. Однако использование питательной среды с подобными субстратами в качестве источников углерода вполне допустимо.

Предварительная стерилизация среды с пшеничными отрубями, которая происходит при повышенном давлении и высокой температуре, приводит субстрат в более доступную для использования грибами форму.

По-видимому, пшеничные отруби, в составе которых много целлюлозы, являются более подходящим источником углерода для биосинтеза фермента триходермой. И это вполне понятно, так как в естественных условиях обитания в почве представители данного рода утилизируют целлюлозосодержащие растительные остатки, как бы адсорбируясь на них. Не исключено, что адгезия мицелия гриба на пшеничных отрубях способна изменять интенсивность и направленность физиолого-биохимических процессов, осуществляемых триходермой [5]. В результате такой иммобилизации возможно значительное изменение проницаемости клеточных стенок.

Гемицеллюлозный субстрат — пшеничные отруби, как показали наши исследования, является индуктором биосинтеза L-лизин- α -оксидазы триходермой.

В дальнейших экспериментах нами была изучена субстратная специфичность штаммов — продуцентов фермента по отношению к природным аминокислотам, которые могут быть субстратом для роста гриба рода триходерма.

Проявляемая активность в отношении деструкции L-лизина для каждого штамма была принята за 100%.

Полученные результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Изучение субстратной специфичности по отношению к природным аминокислотам штаммов рода *Trichoderma* на среде с пшеничными отрубями

№ п/п	Вид субстрата	№ штаммов				
		1	2	3	4	5
1	DL-лизин	100%	100%	100%	100%	100%
2	DL-лейцин	0	0	5,4%	0	0
3	L-валин	0	0	2,5%	0	0
4	DL-фенилаланин	10,5%	8%	0,9%	0	0
5	L-гистидин	0	0	1,4%	0	1,4%
6	L-треонин	0	0	1,4%	0	0
7	L-аргинин	0	0	5,6%	0	11,6%
8	DL-серин	0	0	0	0	0
9	L-триптофан	0	0	1,2%	0	0
10	L-аланин	0	0	1,7%	0	0
11	L-пролин	0	0	2,8%	0	0
12	L-цистеин	0	0	0	0	0
13	L-аспарагин	0	0	0	0	0
14	DL-аспарагиновая кислота	0	0	0	0	0
15	DL-метионин	7,2%	1,2%	3,8%	0	4%
16	DL-изолейцин	0	0	1,0%	0	0
17	DL-тирозин	0	0	2,7%	0	0
18	DL-глицин	0	0	3,8%	0	0
19	L-глутамин	0	0	1,1%	0	1,6%
20	DL-глутаминовая кислота	0	0	0	0	0

* № штаммов указаны в условиях эксперимента выше.

Как видно из табл. 3, высокой специфичностью обладали штаммы *Tr. viride Pers ex S.F. Grey*, *Tr. harzianum Rifai*, *Tr. longibrachiatum Rifai* ВКМФ-2025. Штамм № 3

вызывал деструкцию почти всех природных аминокислот, за исключением DL-серина, L-цистеина, L-аспарагина, DL-аспарагиновой, DL-глутаминовой кислот. Однако проявляемая активность была в пределах от 5,6% до 0,9% в сравнении со 100% деструкцией L-лизина оксидазой триходермы. Из представленных результатов видно, что каждый вид гриба при утилизации пшеничных отрубей проявляет разный спектр аминоксидазных активностей.

В последующих экспериментах нами исследовалась зависимость проявления аминоксидазных активностей триходермой от срока использования субстрата — пшеничных отрубей (табл. 4).

Таблица 4

Изучение субстратной специфичности штамма *Tr. harzianum* Rifai в зависимости от возраста культуры, выращенной на среде с пшеничными отрубями

Возраст культуры	3-и сутки роста	8-е сутки роста	18-е сутки роста
Активность по лизину У/мл	3,9	5,4	6,7
Субстрат*			
1. DL-лизин	100%	100%	100%
2. DL-фенил-аланин	1,2%	10,0%	18,0%
3. L-аргинин	0	0	7,0%
4. DL-метионин	0	1,0%	6,0%

*Штамм № 2 не проявлял оксидазную активность в отношении аминокислот валина, треонина, серина, триптофана, аланина, пролина, цистеина, аспарагина, аспартата, изолейцина, тирозина, глицина, глутамата, лейцина.

Как видно из табл. 4, наблюдается расширение спектра проявления аминоксидазных активностей штаммом № 2 в зависимости от срока культивирования гриба на среде с пшеничными отрубями. Причем проявляемая активность в отношении деструкции аминокислоты L-лизина всегда была наибольшей.

Известно, что скорость любой ферментативной реакции зависит от pH реакционной среды. Поэтому вполне оправданным было исследование субстратной специфичности оксидаз L-аминокислот штаммов триходермы при разных значениях pH реакционной среды.

С этой целью были отобраны два штамма, активные в отношении деструкции L-лизина: штамм № 2 — *Tr. harzianum* Rifai, штамм № 5 — *Tr. aureoviride* Rifai. Исследование проводилось с использованием в реакционной среде ацетатного буфера pH 5,0 и глицин-HCl буфера pH 8,0.

Результаты эксперимента представлены в табл. 5.

Таблица 5

Изменения субстратной специфичности штаммов рода *Trichoderma* при разных значениях pH реакционной смеси (8-е сутки роста)

Штамм	№ 2		№ 5	
	Активность по лизину, У/мл	pH буфера	Активность по лизину, У/мл	pH буфера
Активность по лизину, У/мл	5,7	3,0	6,4	3,0
pH буфера	5,0	8,0	5,0	8,0
Субстрат*				
1. DL-лизин	100%	100%	100%	100%
2. DL-фенил-аланин	8,6%	2,0%	5,6%	6,8%
3. L-гистидин	0	0	7,4%	5,2%
4. L-аргинин	0	13,1%	2,0%	22,0%
5. DL-метионин	0,7%	0	2,4%	3,7%
6. L-глутамин	0	0	1,5%	0,8%

*Штаммы № 2, № 13 не проявляли оксидазной активности в отношении аминокислот валина, треонина, серина, триптофана, аланина, пролина, цистеина, аспарагина, аспартата, изолейцина, тирозина, глицина, глутамата, лейцина.

Как видно из табл. 5, наибольшая оксидазная активность была в отношении деструкции L-лизина. Для штамма № 2 при pH 5,0 L-лизин- α -оксидазная активность составила 5,7 U/мл, а при pH 8,0, соответственно, 3,0 U/мл.

Для штамма № 5 при pH 5,0 L-лизин- α -оксидазная активность составила 6,4 U/мл, а при pH 8,0, соответственно, 3,0 U/мл.

Для штамма *Tr. harzianum Rifai* подщелачивание реакционной среды до pH 8,0 приводило к появлению L-аргинин- α -оксидазной активности и снижению активности в отношении деструкции L-метионина.

L-фенилаланин- α -оксидазная активность снижалась в четыре раза при использовании глицин-HCl буфера pH 8,0.

Для штамма *Tr. aureoviride Rifai* (штамм № 5) спектр проявляемых оксидазных активностей в отношении L-аминокислот не менялся с изменением pH среды, однако также, как и у предыдущего штамма, оксидазная активность в отношении деструкции L-лизина была наибольшей.

Количественный показатель деструкции аминокислоты L-аргинина значительно возрастал при определении оксидазной активности при pH реакционной среды 8,0 как для штамма № 2, так и для штамма № 5. Причем для последнего увеличение L-аргинин- α -оксидазной активности возрастало в десять раз.

Как видно из представленных результатов, каждый штамм различных представителей триходермы — продуцентов L-лизин- α -оксидазы проявляет свой специфический спектр деструкции аминокислот, который может служить биохимической характеристикой штамма.

Очевидно, что изучение спектра деструкции аминокислот разных штаммов грибов необходимо проводить при разном значении pH реакционной среды, подбирая оптимальные условия для ее проявления.

Можно предположить, что при использовании гемичеселлюлозного субстрата штаммы грибов рода триходерма в природных условиях могут утилизировать аминокислоты в широком диапазоне pH, что позволяет этому роду конкурировать в почве с другими микроорганизмами.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Kusakabe C., Kodama K., Kununaka A., Yoshino H., Soda K. Extracellular production of L-lysine- α -oxidase in wheat bran culture of a strain of *Trichoderma viride* // *Agric. Biol. Chem.* — 1979. — 43. — 12. — P. 2531—2533.
- [2] Kusakabe C., Kodama K., Kununaka A., Yoshino H., Soda K., Misono H. A new antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma viride* // *J. Bio. chim.* — 1980. — Vol. 255. — № 3. — P. 976—981.
- [3] Lowry O.H., Rosebrogh N.Y., Farr A.L., Randall R.Y. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1954. — Vol. 193. — P. 265—275.
- [4] Алимova Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. — Казань: КГУ, 2006.
- [5] Смирнова И.П. Продуценты оксидаз L-аминокислот и возможные области их применения // *Биотехнология.* — 1991. — № 3. — С. 3—7.
- [6] Смирнова И.П., Потапова О.Л. Индукция синтеза оксидаз L-аминокислот биостимуляторов бактериального и грибного происхождения // *Биотехнология.* — 1991. — № 2. — С. 25—26.

- [7] Смирнова И.П., Сяткин С.П., Березов Т.Т. Спектрофотометрический метод определения L-лизин- α -оксидазы // *Вопр. мед. химии*. — 1984. — №1. — С. 133—136.
- [8] Смирнова И.П., Гуськова Т.А., Пушкина Т.В., Подборонов В.М. Антибактериальная и антимикробная активность L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma harzianum* Rifai // *Сибирь—Восток*. — 2003. — Вып. 1 (61). — С. 10—12.

**GEMYCELLULOSE SUBSTRATUM INDUCTOR
OF BIOSYNTHESIS OF L-LYSIN- α -OXIDASE (LO)
BY TRICHODERMA SP.**

**I.P. Smirnova¹, J.A. Shneider²,
A.A Shevchenko¹**

¹Department of biochemistry

²Department of botany, plant physiology,
plant pathology and agrobiotechnology
Russian People's Friendship University

Miklukho-Maklaya str., 8/2, Moscow, Russia, 117198

Studies on the biosynthesis of L-lysine- α -oxidase enzyme by *Trichoderma sp.* were carried out using various growing methods and media with various carbon sources. The enzyme was actively synthesized only on the wheat brans medium. The growth of *Trichoderma* strains on the gemycellulose substrate medium showed a different range of L-amino acid oxidase activity. With the *Trichoderma* culture getting older, the range of amino-oxidase activity widened, but for each strain it remained unique.

Key words: enzyme, trichoderma, aminooxidase, biosynthesis.