
БИОЛОГИЧЕСКАЯ И БИОХИМИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ МЕТАБОЛИТОВ ПОЧВЕННОГО САПРОФИТА *TRICHODERMA HARZIANUM RIFAI*

Е.Н. Пакина¹, Ю.А. Шнейдер¹,
И.П. Смирнова²

¹Кафедра ботаники, физиологии, патологии растений и агробиотехнологии

²Кафедра биохимии

Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

Исследована стабильность метаболитов почвенного сапрофита *Trichoderma harzianum Rifai* в процессе длительного хранения. Показано, что в процессе длительного хранения культуры почвенный сапрофит *Trichoderma harzianum Rifai* сохраняет свою ферментативную и биологическую активность.

Ключевые слова: почвенный сапрофит, стабильность метаболита, субстратная специфичность, ингибирование роста, инактивация фермента.

В настоящее время одним из наиболее изучаемых грибов является род *Trichoderma*. Это единственный род, каждый вид которого представлен в Генетическом банке одним геном, а многие виды представлены последовательностью двух и более генов [1]. Повышенный интерес к этому роду обусловлен практической и экологической его значимостью. На кафедре биохимии РУДН в течение ряда лет проводятся исследования L-лизин- α -оксидазы — метаболита гриба триходерма [2—11]. Исследования гриба были продолжены нами совместно с сотрудниками кафедры ботаники, физиологии, патологии растений и агробиотехнологии. Целью данного исследования являлось изучение биологической и биохимической стабильности метаболитов почвенного сапрофита *Trichoderma harzianum Rifai*.

Материал и методы. В качестве объекта изучения стабильности метаболитов был взят экстракт гриба *Trichoderma harzianum Rifai* — продуцента L-лизин- α -оксидазы, полученный при глубинном культивировании на среде с пшеничными отрубями и хранившийся при температуре 4 °С в течение 7 лет.

Изучение биологических свойств метаболитов гриба проводили на коллекции фитопатогенных и сапрофитных грибов (24 штамма), полученных на кафедре микологии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. За проявлением антагонистических свойств метаболитов гриба триходермы наблюдали на среде сусло-агар. На одну половину чашек Петри с сусло-агаром наносили метаболиты *Trichoderma*, на вторую высевали колонии исследуемых грибов. Контролем служил высев тех же грибов на чашки Петри без нанесения метаболита. Чашки помещались на 5 суток в термостат с температурой 28 °С. В качестве маркера биохимической активности метаболитов гриба изучали стабильность фермента L-лизин- α -оксидазы, продуцируемого этим штаммом [2].

Определение активности L-лизин- α -оксидазы. Активность лизин-оксидазы в водном экстракте культуры рассчитывали по приросту H_2O_2 , количество которой определяли спектрофотометрическим орто-дианизидиновым микрометодом. Сущность колориметрического метода заключалась во взаимодействии образующейся в реакции H_2O_2 с орто-дианизидингидрохлоридом. Инкубационная смесь содержала 20 мкг пероксидазы, 250 мкг орто-дианизидингидрохлорида и 0,1—0,5 мг белка в 1 мл конечного объема. После 20 мин. инкубации 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 контрольной пробы (без пероксидазы).

Для построения калибровочной кривой молярность свежеприготовленного раствора H_2O_2 определяли перманганатометрией. Субстратом 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 — орто-дианизидингидрохлорид («Merck»). 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. Концентрацию белка в образце определяли по методу Лоури [12].

При исследовании термостабильности метаболитов почвенного сапрофита *Trichoderma harzianum Rifai* опыты ставились в трехкратных повторностях, показатели активности снимались каждые 30 минут для температур 60—70 °С и 10 секунд для 80 °С соответственно.

Изучение субстратной специфичности метаболитов триходермы проводили на 20 аминокислотах («Reanal», Венгрия).

Результаты исследования. Как видно из данных табл. 1, на второй день культивирования во всех чашках Петри был отмечен одинаково интенсивный рост колоний грибов. Однако на 5-е сутки в ряде чашек Петри было отмечено ингибирование роста грибов продуктами метаболизма триходермы, в то время как в контрольном варианте на 5-е сутки все культуры грибов показали интенсивный рост.

Грибы *Botryotichum piluliferum*, *Fusarium poae*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides*, *Paecilomyces variotii* почти полностью приостановили рост, в то время как представители рода *Penicillium* на пятые сутки заняли практически всю поверхность чашек Петри. Грибы рода *Aspergillus* неодинаково реагировали на присутствие метаболитов *Trichoderma sp.* Так, *Aspergillus ochaceus*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus fischeri*, так же как и грибы рода *Penicillium*, активно росли все пять суток культивирования, в то время как *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus* приостановили рост в присутствии метаболитов *Trichoderma harzianum Rifai*. Таким образом, метаболиты триходермы стабильны и не теряют своей биологической активности в процессе длительного хранения, проявляя в отношении ряда грибов свои антагонистические свойства.

Таблица 1

**Ингибирование роста сапрофитных и патогенных грибов
метаболитами *Trichoderma harzianum* Rifai**

№	Культура	2-е сутки	5-е сутки	5-е сутки контроль ^{**}
1	<i>Aspergillus niger</i>	+*	++*	+++*
2	<i>Aspergillus ochraceus</i>	+	+++	+++
3	<i>Aspergillus terreus</i>	+	++	+++
4	<i>Aspergillus ustus</i>	+	+++	+++
5	<i>Aspergillus versicolor</i>	+	++	+++
6	<i>Aspergillus flavus</i>	+	++	+++
7	<i>Aspergillus fischeri</i>	+	+++	+++
8	<i>Penicillium thomii</i>	+	+++	+++
9	<i>Penicillium purpurogenum</i>	+	+++	+++
10	<i>Penicillium janthinellum</i>	+	+++	+++
11	<i>Penicillium simlicissimum</i>	+	+++	+++
12	<i>Penicillium chrysogenum</i>	+	+++	+++
13	<i>Penicillium jannczewskii</i>	+	+++	+++
14	<i>Penicillium canescens</i>	+	+++	+++
15	<i>Penicillium vinaceum</i>	+	+++	+++
16	<i>Penicillium avenaceum</i>	+	+++	+++
17	<i>Fusarium poae</i>	+	+	+++
18	<i>Fusarium solani</i>	+	+	+++
19	<i>Fusarium oxysporum</i>	+	+	+++
20	<i>Fusarium verticillioides</i>	+	+	+++
21	<i>Botryotichum piluliferum</i>	+	+	+++
22	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+	++	+++
23	<i>Paecilomyces variotii</i>	+	+	+++
24	<i>Trichotecium roseum</i>	+	++	+++

Примечания: * задержка роста грибов выражалась в мм; + — задержка роста 10—20 мм; ++ — задержка роста 0—10 мм; +++ — отсутствие задержки роста; ** Рост грибов в отсутствие метаболитов триходермы.

При исследовании влияния температуры на стабильность метаболитов *Trichoderma harzianum* Rifai использовался фермент L-лизин- α -оксидаза, синтезируемый этой культурой.

Как видно из рис. 1, при температуре 37 °С фермент стабилен в течение 3 часов, при температуре 50—60 °С снижение стабильности отмечалось незначительно при инкубации до 3-х часов. При температуре 70 °С наблюдалась резкая инактивация фермента: потеря L-лизин- α -оксидазной активности по сравнению с инкубацией при 37 °С составляла почти 50% в течение 10 минут, а к 3 часам инкубации фермент полностью терял активность. При температуре 80 °С в течение 30 секунд наблюдалось снижение активности свежеприготовленного экстракта в среднем на 40% и фермент полностью инактивировался в течение 60 секунд. У фермента, находившегося на хранении, инактивация при 80 °С наблюдалась уже в течение 10 секунд.

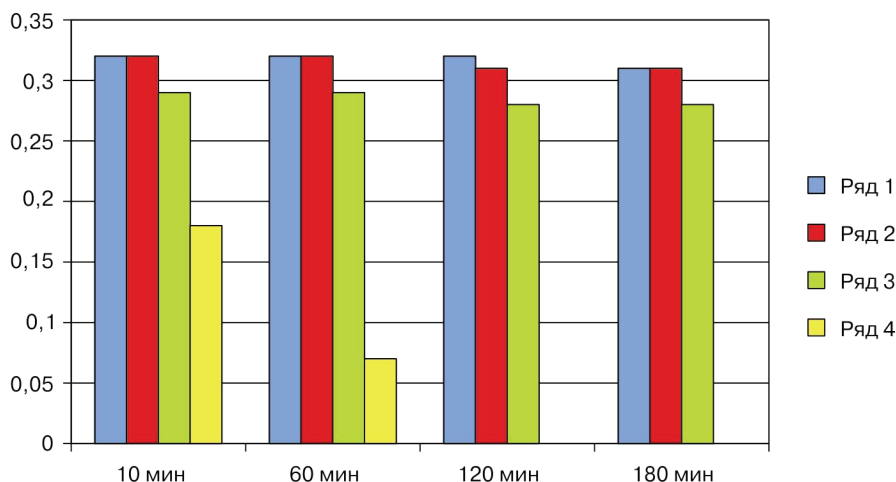


Рис. 1. Стабильность L-лизин- α -оксидазы после 7 летнего хранения: ряд 1 — температура 37 °С, ряд 2 — температура 50 °С, ряд 3 — температура 60 °С, ряд 4 — температура 70 °С; на оси ординат показана разность оптической плотности по сравнению с контролем

На основании проведенных опытов можно сделать заключение, что метаболиты почвенного сапрофита *Trichoderma harzianum* Rifai стабильны в течение семилетнего хранения при температуре +4 °С.

Исследование субстратной специфичности оксидазы триходермы в отношении 20 аминокислот обнаружило, что метаболиты триходермы проявляют спектр, аналогичный ранее показанному [7]: относительно L-лизина была показана высокая активность, а по отношению к L-метионину — в следовых количествах. Оксидазных активностей к другим аминокислотам не было.

Целью дальнейших исследований было изучение изменения рН экстракта метаболитов триходермы на ее ферментативную активность. Установлено, что L-лизин- α -оксидаза триходермы, находившаяся при хранении в течение длительного срока, имеет оптимум рН, равный 5,7—5,9. При изменении значения рН до 4,4 и 8,0 наблюдается снижение активности фермента в 3 и 2 раза соответственно. При испытаниях буферных систем (цитратного, ацетатного, фосфатного буферов) наилучшим при окислении L-лизин- α -оксидазы оказался фосфатный буфер (табл. 2, рис. 2).

Таблица 2

Сравнительная характеристика буферных систем при окислении L-лизин- α -оксидазы

Цитратный буфер			Ацетатный буфер			Фосфатный буфер		
рН	ΔА, разведение пробы		рН	ΔА, разведение пробы		рН	ΔА, разведение пробы	
	1 : 3	1 : 4		1 : 3	1 : 4		1 : 3	1 : 4
4,4	0,203	0,073	4,4	0,250	0,090	5,9	0,360	0,230
4,6	0,280	0,150	4,6	0,316	0,150	6,4	0,295	0,165
5,0	0,320	0,180	5,0	0,340	0,180	7,0	0,270	0,140
5,6	0,340	0,210	5,4	0,345	0,185	7,6	0,263	0,133
6,0	0,270	0,140	5,6	0,350	0,193	8,0	0,245	0,115

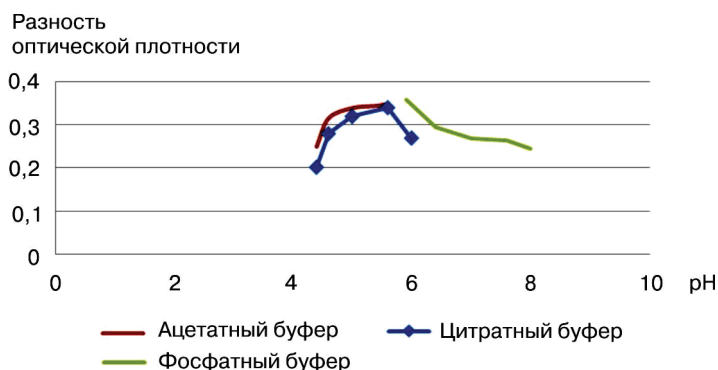


Рис. 2. Влияние pH на активность L-лизин-α-оксидазы

Таким образом, ферментативная активность в отношении деструкции аминокислот проявляется в той же кислотности среды и аналогична результатам, полученным ранее, что свидетельствует о стабильности метаболитов гриба при длительном хранении [7].

Полученные результаты свидетельствуют о возможном влиянии *Trichoderma harzianum* Rifai на формирование почвенной микрофлоры; гриб опосредованно влияет на корневую систему растений, проявляя свою активность при разной кислотности среды.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Алимova Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. — Казань, КГУ, 2006.
- [2] Смирнова И.П., Сяткин С.П., Березов Т.Т. Спектрофотометрический метод определения L-лизин-α-оксидазы // *Вопр. мед. химии*. — 1984. — № 1. — С. 133—136.
- [3] Смирнова И.П., Березов Т.Т. Изучение субстратной специфичности оксидаз L-аминокислот некоторых штаммов рода *Trichoderma* sp. // *Микробиология*. — 1989. — Т. 58. — Вып. 1. — С. 49—53.
- [4] Смирнова И.П. Продуценты оксидаз L-аминокислот и возможные области их применения // *Биотехнология*. — 1991. — № 3. — С. 3—7.
- [5] Смирнова И.П., Потапова О.Л. Индукция синтеза оксидаз L-аминокислот биостимуляторов бактериального и грибного происхождения // *Биотехнология*. — 1991. — № 2. — С. 25—26.
- [6] Смирнова И.П. Новый биохимический маркер в характеристике грибных культур // *Биотехнология*. — 1994. — № 4. — С. 28—30.
- [7] Смирнова И.П., Алексеев С.Б. Окислительное дезаминирование некоторых аминокислот продуктами метаболизма триходермы // *Биотехнология*. — 1998. — № 2. — С. 1—5.
- [8] Смирнова И.П., Гуськова Т.А., Пушкина Т.В., Орлова В.С. L-лизин-α-оксидаза и ее противомикробные свойства / *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. Тезисы 4 Международной конференции МАКМАХ*. — М., 2001. — С. 3.
- [9] 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.
- [10] Смирнова И.П., Пушкина Т.В., Крылова Л.Ю. Антимикробная активность L-лизин-α-оксидазы / *Тез. II Всеросс. конгресса по медицинской микробиологии*. — М., 2004.

- [11] *Smirnova I.P., Sale M.* L-aminoacid oxydases in *Trichoderma* / V-th Intern. Congr. of plant pathology. — Kyoto, 1989. — P. 498.
- [12] *Lowry O.H., Roserbrogh N.Y., Farr A.L., Randall R.Y.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1954. — Vol. 193. — P. 265—275.

**BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STABILITY
OF SOIL SAPROPHITE *TRICHODERMA
HARZIANUM RIFAI* METABOLITES**

**E.N. Pakina¹, J.A. Shneider¹,
I.P. Smirnova²**

¹Department of botany, plant physiology, plant pathology and agrobiotechnology

²Department of biochemistry

Russian People's Friendship University

Miklucho-Maklay str., 8/2, Moscow, Russia, 117198

Metabolic stability of soil saprophyte *Trichoderma harzianum* Rifai was investigated under the conditions of long-term storage. It was showed that under the conditions of long-term storage the soil saprophyte *Trichoderma harzianum* Rifai preserves it's enzymatic and biological activity.

Key words: soil saprophyte, metabolic stability, substrate specificity, growth inhibition, enzyme inactivation.