

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ САПРОФИТНОГО ГРИБА ТРИХОДЕРМА И БИОСИНТЕЗ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ

Ю.А. Шнейдер¹, А.С. Хомик², Л.М. Кишмахова²,
И.П. Смирнова³, А.А. Шевченко³

¹Кафедра ботаники, физиологии растений и агробиотехнологии

²Кафедра общей фармакологической и биомедицинской технологии

³Кафедра биохимии

Российский университет дружбы народов

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

Исследован рост гриба рода триходерма и биосинтез фермента L-лизин- α -оксидазы в зависимости от поверхностного и глубинного способов культивирования. Установлены факторы, регулирующие активность метаболита триходермы L-лизин- α -оксидазы: зависимость биосинтеза фермента от спорообразования гриба, количества инокулята, аэрации, значения исходной кислотности ферментационной среды, количества источников углерода и азота, степени их усвояемости. Показана возможность вторичного использования субстрата для получения фермента в лабораторных условиях.

Ключевые слова: триходерма, метаболит, фермент, культивирование, биосинтез.

Ферменты различных видов грибов привлекают внимание многих исследователей с целью изучения физиологии и биохимии продуцентов, а также возможности использования для практических целей [1—7].

В работе японских исследователей было показано, что гриб *Trichoderma viride* U-244-2 — продуцент L-лизин- α -оксидазы — образует фермент только при поверхностном выращивании [7].

Ранее нами был найден штамм, продуцирующий фермент L-лизин- α -оксидазу в условиях глубинного культивирования; данная работа является продолжением этих исследований, поскольку практическая значимость L-лизин- α -оксидазы — метаболита триходермы — не вызывает сомнений, а распространенность триходермы в почвенной микрофлоре свидетельствует о заметной экологической роли этого гриба [8; 9].

Целью данных исследований являлось изучение условий культивирования *Trichoderma harzianum* Rifai и образования его метаболита — L-лизин- α -оксидазы — при глубинном и поверхностном выращивании, а также установление факторов, регулирующих активность L-лизин- α -оксидазы: зависимость биосинтеза

фермента от спорообразования триходермы, количества инокулята, аэрации, значения исходной кислотности ферментационной среды, количества источника углерода и азота, степени их усвояемости. В цели исследования входило также изучение возможности вторичного использования субстрата для получения фермента в лабораторных условиях.

Условия эксперимента. Культивирование триходермы в условиях поверхностного выращивания. Штамм *Tr. harzianum* выращивали на среде суслоагара в течение 7 суток в термостате при 28 °С. Полученную культуру со средой (слой толщиной 1—1,5 см) вносили в колбу на 250 мл со средой следующего состава: 7 мл 11,4% NaNO₃, 10 г пшеничных отрубей, 10 мл H₂O. Культивирование осуществляли в течение 14-ти дней при температуре 28 °С. Затем в колбу добавляли 100 мл H₂O, в течение 2-х часов встряхивали, полученную биомассу отжимали через марлю. Полученный водный экстракт использовали для определения активности L-лизин- α -оксидазы.

Определяли активность фермента спектрофотометрическим ортодианизидиновым микрометодом по количеству образующейся в процессе ферментативной реакции H₂O₂ [10]. За единицу активности фермента принимали количество фермента, катализирующего образование 1 нмоль H₂O₂ на 1 мл культуральной жидкости за минуту в стандартных условиях.

Вторичное использование исходного субстрата для получения фермента. Штамм *Tr. harzianum* выращивали вышеописанным способом. Полученный водный экстракт использовали (первая экстракция), а к оставшейся биомассе добавляли стерильную воду, дорастивали культуру в течение 3—4 сут. в термостате при 28 °С (вторая экстракция), а затем вновь использовали (третья экстракция) для получения фермента в лабораторных условиях.

Глубинное культивирование триходермы. Инокулят для глубинного культивирования триходермы выращивали способом, указанным выше, в термостате при 28 °С в течение 14 суток и использовали для посева на ферментационную среду.

Ферментацию триходермы проводили в колбах на 250 мл на термостатированном встряхивателе типа 357 (ПНР) при 28 °С в течение 5 суток, амплитуда № 6, 120 оборотов в минуту.

Использовали ферментационную среду следующего состава на 100 мл воды: пшеничные отруби — 5 г, NaNO₃ (или (NH₄)₂SO₄) 0,9 г. Начальный pH среды — 5,5—6,0. Количество инокулята, выросшего на твердой среде с пшеничными отрубями, составляло 0,5—1 г от всего количества.

Определение числа спор в пробах. Подсчет числа спор гриба проводили в камере Горяева. Количество спор в 1 мл водного экстракта определяли по формуле:

$$X = \frac{a \times 400}{b} \cdot 10^3, \text{ спор/мл,}$$

где X — искомое количество спор; a — сумма спор, сосчитанных в определенном объеме камеры; b — число малых квадратов.

Повторность опытов 3-кратная.

Определение белка по Лоури. Белок определяли по модифицированному методу Лоури [11]. В качестве стандарта использовали 0,05% раствор кристаллического бычьего альбумина (фирма Reanal, Венгрия). Результаты опытов обрабатывали статистическим методом Монцевичюте-Эрингене.

Результаты и обсуждение. На первых этапах работы была исследована корреляция процесса спорообразования и биосинтеза фермента при глубинном культивировании на среде с разной концентрацией $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в динамике развития культуры.

Как видно на рис. 1, интенсивность спорообразования на средах с разной концентрацией $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ неодинакова. Количество спор в единице объема водного экстракта при выращивании культуры на среде с концентрацией $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,65 г/100 мл значительно выше, чем при использовании в среде концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,95 г/100 мл.

Биосинтез фермента коррелировал с количеством образовавшихся спор. Уже через пять суток роста культуры отмечалось спорообразование триходермы на среде, где активность фермента была 0,24 Е/мл, в четыре раза выше по сравнению со средой, где активность составляла 0,15 Е/мл. К шестым суткам роста культуры соотношение биосинтеза метаболита и спорообразования составило 3 : 1, а к седьмым суткам роста — 2,3 : 1.

Можно сделать заключение, что количество $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, используемого в качестве источника азота для роста гриба, влияет на процесс спорообразования триходермы и биосинтез фермента.

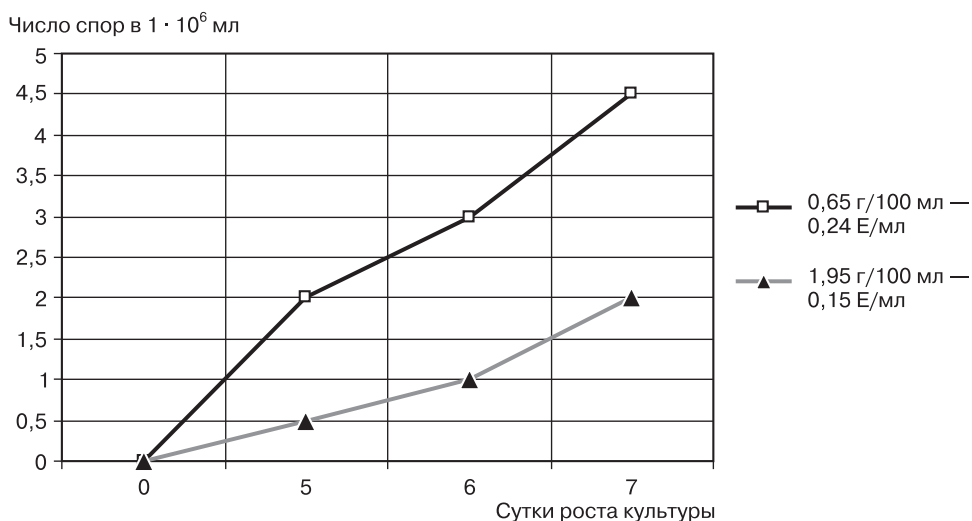


Рис. 1. Число спор в 1 мл водного экстракта на средах с различными концентрациями $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

В последующих экспериментах нами изучалось влияние количества спор триходермы на образование L-лизин- α -оксидазы в условиях глубинного культивирования. Результаты опытов представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Влияние количества спор триходермы
на образование L-лизин- α -оксидазы (5-е сутки роста)**

Варианты опытов	Конечн. pH	Белок, γ /мл	Активн., У/мл	Активн., Е/мг
1 5 мл суспензия спор*	4,6	295	0,2	0,04
2 10 мл суспензия спор	5,0	250	0,8	0,08
3 15 мл суспензия спор	5,2	280	1,0	0,13

*Примечание. В опыте использовалась суспензия спор, полученная путем смыва культуры, выращенной на пшеничных отрубях с одной колбы (8-е сутки роста).

Как видно из табл. 1, при глубинном культивировании триходермы и использовании в качестве посевного материала спор гриба биосинтез L-лизин- α -оксидазы незначителен.

Чрезвычайная сложность разработки технологии выращивания грибов рода триходерма для получения фермента в условиях глубинного культивирования объясняется тем, что виды этого рода в условиях глубинного культивирования способны образовывать хламидоспоры, при этом последовательно происходит редукция числа спор.

В последующих опытах с целью изучения условий максимального образования L-лизин- α -оксидазы при глубинном культивировании мы использовали в качестве посевного материала мицелий гриба со средой. Результаты эксперимента представлены в табл. 2.

Таблица 2

**Влияние количества мицелия гриба
на образование L-лизин- α -оксидазы (5-е сутки роста)**

Варианты опытов	Конечн. pH	Белок, г/мл	Активн., У/мл	Активн., Е/мг
20 г мицелия гриба + среда	5,7	300	2,0	0,23
40 г мицелия гриба + среда	5,7	350	1,0	0,10
60 г мицелия гриба + среда	5,5	350	1,2	0,12

Мицелиальная форма инокулята повышает активность фермента; она была нами использована для максимального накопления фермента с последующим выделением и очисткой метаболита.

Известно, что биосинтез многих ферментов увеличивается либо снижается в зависимости от аэрации. Из результатов исследования влияния степени аэрации на образование L-лизин- α -оксидазы при глубинном культивировании гриба (табл. 3) видно, что повышенное число оборотов в минуту (120 об./мин.) способствует увеличению активности фермента. Максимум образования фермента приходится на 4-е сутки роста культуры.

Таблица 3

Влияние аэрации на образование L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma harzianum* Rifai

Количество оборотов 100 об./мин.				
Сутки роста	Конечн. pH	Белок, γ /мл	Активн., У/мл	Активн., Е/мг
2	6,8	227	2,77	0,43
4	6,1	240	3,97	0,56
6	6,1	263	2,86	0,52
Количество оборотов 120 об./мин.				
Сутки роста	Конечн. pH	Белок, γ /мл	Активн., У/мл	Активн., Е/мг
2	5,4	153	3,23	1,10
4	5,6	205	4,11	1,18
6	6,4	265	3,94	0,73

Если судить по данным литературы, то оптимальное значение рН питательных сред, предназначенных для культивирования мицелиальных грибов, лежит в пределах 5—6. Нами было изучено влияние исходного рН среды на образование фермента (табл. 4).

Таблица 4

Влияние исходного рН среды на образование L-лизин- α -оксидазной активности гриба *Trichoderma harzianum*

Сутки роста	рН исходн.	Белок, μ /мл	Активн., Е/мг
1	4,5	170	0,25
	5,6	230	0,89
	7,0	170	0,35
2	4,5	220	0,19
	5,6	250	0,31
	7,0	210	0,12

Как видно из табл. 4, максимальное образование фермента наблюдается уже на первые сутки роста гриба при рН = 5,6. При этих же условиях наблюдается лучший рост культуры и большее количество белка.

В более кислой среде, при рН = 4,5, гриб образует биомассу в виде отдельных крупных зернистых колоний, однако активность фермента в этих условиях низкая. В среде, имеющей исходный рН = 7,0, активность фермента также достаточно низкая.

Как в природных условиях, так и в лабораторных условиях биосинтез ферментов зависит от степени усвояемости используемого субстрата. Выше нами было показано (рис. 1), что концентрации источника азота $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ влияют на синтез метаболита.

Известно, что питательные среды в лабораторных испытаниях обычно стерилизуют в автоклаве. Однако нагревание в автоклаве может вызывать разрушение или изменение состава некоторых компонентов питательной среды. Нами изучалось образование фермента в связи с использованием сред, автоклавированных при разных режимах. Результаты представлены на табл. 5.

Таблица 5

Влияние режима автоклавирования на рост гриба *Trichoderma harzianum* и образование фермента в условиях стационарного выращивания на жидкой среде

Режим автоклавирования	Сутки роста	рН конечн.	Белок, μ /мл	Активн., У/мл	Активн., Е/мг
1 атм. 30 мин.	2	6,05	90	1,38	0,23
	4	5,60	120	1,50	0,17
	6	5,55	120	1,30	0,15
1 атм. 1 час	2	6,20	130	4,60	1,46
	4	6,20	146	5,70	1,30
	6	6,05	200	4,20	0,73

Как видно из табл. 5, при автоклавировании среды в течение часа при 1 атмосфере рост гриба и активность фермента выше, чем при тридцатиминутном автоклавировании. Белка со вторых суток роста образуется больше, чем при автоклавировании среды в течение 1 часа. По-видимому, сложные сахара, полисахариды и другие компоненты, содержащиеся в пшеничных отрубях, частично гидролизуются и становятся более доступными для роста культуры и биосинтеза фермента.

С целью максимального накопления метаболита гриба триходермы в лабораторных условиях для дальнейшего выделения и изучения его нами исследовалась возможность вторичного использования исходного субстрата (пшеничных отрубей) для получения фермента. Эксперименты осуществлялись в стационарных условиях.

В табл. 6 представлены результаты проведенного опыта.

Таблица 6

Вторичное использование исходного субстрата для получения фермента

Последовательность экстракций	Белок мг/мл	Активность, Е/мг	Конечный рН
Первая экстракция (7—8-е сутки роста)	4,8	0,6	7,1
Вторая экстракция (3—4-е сутки роста)	3,2	0,4	7,5
Третья экстракция (3—4-е сутки роста)	3,4	0,4	7,9

Через 3—4 суток доращивания гриба триходермы получали экстракт, а культуру еще раз использовали (табл. 6). Скорость роста гриба в условиях поверхностного культивирования при втором и третьем использовании среды несколько снижалась. Это проявлялось в снижении количества белка в смывах. Если после первой экстракции количество белка составило 4,8 мг/мл, то при второй и третьей экстракции — 3,2 мг/мл и 3,4 мг/мл соответственно, при этом наблюдалось подщелачивание среды. Если конечный рН первой экстракции был 7,1 на 7—8-е сутки роста, то при последующих (второй и третьей) экстракциях — 7,5 и 7,9 соответственно, а в некоторых повторностях опыта рН повышался до 8,1.

Вторую и третью экстракции проводили на 3—4-е сутки роста гриба; это позволило максимально использовать выросшую поверхностным способом культуру для накопления культуральной жидкости в лабораторных условиях.

Выводы:

— спорообразование триходермы при выращивании культуры на среде с концентрацией $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,65 г/100 мл значительно выше, чем в среде концентрацией $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,95 г/100 мл;

— биосинтез фермента L-лизин- α -оксидазы коррелирует с количеством образованных культурой спор;

— использование мицелиальной формы гриба триходермы повышает активность фермента по сравнению с использованием спор в качестве инокулята;

— повышенное число оборотов в минуту (120 об./мин.) при глубинном культивировании способствует увеличению активности фермента;

— максимальное образование фермента наблюдается при исходном рН среды 5,6;

— при автоклавировании среды в течение часа при 1 атмосфере рост гриба и активность фермента выше, чем при тридцатиминутном автоклавировании;

— возможно вторичное использование субстрата для получения фермента в лабораторных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Ait-Lahsen H., Soler A., Rey M., De La Cruz J., Monte E., Llobell A.* An antifungal glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2001. — Vol. 67. — P. 5833—5869.
- [2] *Antal Z., Manczinger L., Kredics L., Kevei F., Nagy E.* Complete DNA Sequence and analysis of a mitochondrial plasmid in the mycoparasitic strain *Trichoderma harzianum* T95 // *Plasmid.* — 2002. — Vol. 47. — P. 148—152.
- [3] *Bolar J.P., Norelli J.L., Wong K.W., Hayes C.K., Harman G.E.* Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduced vigor // *Phytopathology.* — 2000. — Vol. 90. — P. 72—77.
- [4] *Carsolio C., Benliamou N., Haran S., Cortes C., Gutierrez A., Chet A., Herrera-Estrella A.* Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene *ech42* in Mycoparasitism // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1999. — Vol. 65. — P. 929—935.
- [5] *Giese E.C., Covizzi E.G., Fjarsato D., Dekkera R.F.H., Silva M.L.C., Barbosa A.M.* Botryosphaeran, a new substrate for the production of β -1,3-glucanases by *Bolryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai // *Process Biochemistry.* — 2005.
- [6] *Giese E.C., Covizzi E.G.* Botryosphaeran, a new substrate for the production of β -1,3-glucanases by *Bolryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai // *Process Biochemistry.* — 2005.
- [7] *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.
- [8] *Алимова Ф.К.* Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. — Казань: КГУ, 2006.
- [9] *Смирнова И.П., Шнейдер Ю.А.* Гемилцеллюлозный субстрат — индуктор биосинтеза L-лизин- α -оксидазы триходермой // *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия «Агрономия и животноводство».* — 2010. — № 1. — С. 20—26.
- [10] *Смирнова И.П., Сяткин С.П., Березов Т.Т.* Спектрофотометрический метод определения L-лизин- α -оксидазы // *Вопр. мед. химии.* — 1984. — № 1. — С. 133—136.
- [11] *Lowry O.H., Rosebrogh N.Y., Farr A.L., Randall R.Y.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *Y. Biol. Chem.* — 1954. — Vol. 193. — P. 265—275.

CULTIVATION OF SAPROPHYTIC FUNGUS TRICHODERMA AND BIOSYNTHESIS OF L-LYSINE- α -OXIDASE

Yu.A. Shneyder¹, A.S. Homik², L.M. Kishmahova²,
I.P. Smirnova³, A.A. Shevchenko³

¹Department of botany, plant physiology and agrobiotechnology

²Department of general pharmaceutical and biomedical technology

³Department of biochemistry

Russian People's Friendship University

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

Studies on the growth of the fungus *Trichoderma* and biosynthesis of L-lysine- α -oxidase enzyme were carried out with surface and deep methods of cultivation. Factors which control the activity of *Trichoderma*'s metabolite L-lysine- α -oxidase were determined: relationship between enzyme's biosynthesis and the fungus sporulation; number of inoculum, aeration; initial pH value of fermentation medium; number of sources of carbon and nitrogen, degree of their assimilation. The possibility of secondary use of substrate for production of enzyme in vitro was indicated.

Key words: *Trichoderma*, metabolite, enzyme, culturing, biosynthesis.