

УДК 579.22+577.152.1

Р. В. МИХАЙЛОВА, Ж. Ф. ЦИРКУНОВА, А. Г. ЛОБАНОК, Е. В. ШАХНОВИЧ

**ЗАВИСИМОСТЬ БИОСИНТЕЗА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ
PENICILLIUM VARIANS ОТ УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩИХ КОМПОНЕНТОВ
ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ**

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: mikhailovarv@mail.ru

(Поступила в редакцию 19.09.2013)

Введение. Глюкозооксидаза (β -D-глюкозо: O_2 -1-оксидоредуктаза, КФ 1.1.3.4) (ГО) – ФАД-содержащий фермент семейства GMC (Glucose-methanol-cholin) оксидаз, катализирующий окисление β -D-глюкозы до β -D-глюконо-1,5-лактона и пероксида водорода. Каталитическое действие ГО лежит в основе энзиматического метода определения глюкозы в биологических жидкостях. Фермент находит широкое применение в биосенсорных технологиях экспресс-анализа углеводов и аналитического контроля биотехнологических процессов [1], пищевой и химической промышленности [2, 3].

Основными промышленными продуцентами ГО являются грибы родов *Aspergillus* и *Penicillium* [4]. Востребованность ГО в медицине, биоэлектронике и различных отраслях промышленности диктует необходимость поиска новых высокоактивных продуцентов фермента и проведения исследований по оптимизации питательных сред и условий их культивирования.

В процессе скрининга продуцентов внеклеточной ГО отобран *Penicillium varians* F-102. Изучена гетерогенность гриба [5], выявлен наиболее активный по продукции ГО вариант, который депонирован в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов как *Penicillium varians* БИМ F-563 Д.

Цель работы – изучение влияния углеродсодержащих компонентов питательной среды на биосинтез внеклеточной ГО *P. varians* БИМ F-563 Д.

Объекты и методы исследования. Объект исследования – *P. varians* БИМ F-563Д – продуцент внеклеточной ГО, хранящийся в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов (научной коллекции типовых и промышленноценных непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси). Культуру поддерживали на агаризованной среде Чапека.

P. varians БИМ F-563Д выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды глубинно на качалке при 180–200 об/мин в течение 4 сут. Посевным материалом служила водная споровая суспензия ($0,1$ – $2 \cdot 10^6$ спор/мл), полученная после 14 сут выращивания гриба на агаре Чапека при 24–26 °С. По окончании культивирования биомассу гриба отделяли фильтрованием, высушивали при 105 °С до постоянного веса и ее количество определяли весовым методом, а фильтрат культуральной жидкости (КЖ) использовали для анализов.

При изучении влияния источников углерода на биосинтез ГО *P. varians* БИМ F-563Д за основу была взята среда, содержащая (%): KNO_3 – 0,8; KH_2PO_4 – 0,1; $MgSO_4$ – 0,05; KCl – 0,05; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,00005; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,00017, экстракт солодовых ростков – 2,0. Экстракт солодовых ростков получали по методу Г. Н. Фертман и В. Т. Гирс [6].

В качестве источников углерода использовали моно-, ди- и полисахара в концентрации 6 % по содержанию углерода, крахмал – 6 % по весу.

В качестве эффекторов синтеза ГО применяли пектин, ксилан, карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ), декстран, крахмал, хитозан, желатин (0,05 %), а также этанол (0,1–2,0 %) и бутанол (0,1–1,0 %).

Активность внеклеточной ГО определяли спектрофотометрическим методом [7, 8], выражали в ед/мл КЖ, ед/мг сухой биомассы (продуцирующая способность мицелия) и в процентах к контролю.

Каталазу выявляли качественным методом, визуально определяя интенсивность выделения кислорода, образующегося в результате разложения пероксида водорода за 5 мин при 20 °С.

Результаты и их обсуждение. Углеродсодержащие соединения обеспечивают энергетический и конструктивный обмен микроорганизмов и являются одним из основных компонентов питательных сред для выращивания продуцентов ферментов. Выбор оптимального источника углерода проводится для конкретного продуцента. Для образования ГО грибами в качестве источника углерода в питательных средах, как правило, используется глюкоза или сахароза [4]. Глюкоза является лучшим источником углерода для образования ГО штаммами *Aspergillus niger* [9, 10], *Penicillium variable* Р 16 и *P. adametzii* БИМ-90 [11, 12], а сахароза – для синтеза фермента *P. funiculosum* 46.1 и *P. amagasakiense* ATCC332245 [13, 14].

Т а б л и ц а 1. Влияние источников углерода на рост *P. varians* БИМ F-563Д, синтез ГО и каталазы

Источник С	рН	Биомасса, мг/мл	ГО		Каталаза*
			ед/мл	ед/мг	
Арабиноза	7,7	3,8	0	0	+++
Галактоза	7,7	7,14	0	0	+++
Глюкоза	3,3	4,85	4,6	0,948	–
Лактоза	7,6	3,4	0	0	+++
Мальтоза	6,7	15,4	2,66	0,173	+++
Рамноза	7,7	2,93	0	0	+++
Сахароза	3,4	6,16	6,01	0,976	+
Фруктоза	6,7	10,8	3,44	0,319	++
Крахмал	5,6	12,6	0,52	0,041	+++

* Активность каталазы: знак (–) – отсутствие выделяемого кислорода; знак (+) – единичные пузырьки; знак (++) – среднее количество пузырьков, знак (+++) – интенсивное выделение газа. То же для табл. 2.

Установлено, что *P. varians* БИМ F-563Д утилизирует все испытанные соединения (табл. 1). Максимальное количество биомассы образуется при выращивании гриба на средах с мальтозой, фруктозой, крахмалом и галактозой, а минимальное – на средах с рамнозой, арабинозой, лактозой. Образование внеклеточной ГО продуцентом отмечено при его росте на средах с сахарозой, глюкозой, фруктозой, мальтозой и крахмалом (табл. 1). В конце культивирования продуцента рН КЖ при использовании глюкозы и сахарозы составляет 3,3–3,4, а остальных тестируемых источников углерода – 6,7–7,7. Следует отметить, что во всех вариантах опыта (за исключением варианта с применением глюкозы) гриб синтезирует каталазу.

Синтез ГО грибами зависит как от источника углерода, так и от его концентрации в среде. Изучение влияния концентраций глюкозы и сахарозы (оптимальных источников для образования ГО) на биосинтез фермента *P. varians* БИМ F-563Д показало,

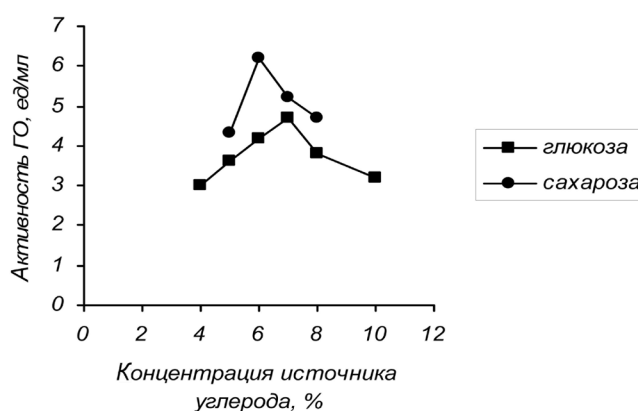


Рис. 1. Влияние концентрации глюкозы и сахарозы на образование ГО *P. varians* БИМ F-563Д

что максимальная продукция обеспечивается использованием в среде 7,0 % глюкозы или 6,0 % сахарозы (рис. 1).

Из приведенных выше данных видно, что уровень образования ГО *P. varians* БИМ F-563Д и продуцирующая способность мицелия гриба при культивировании на питательной среде с сахарозой выше, чем на среде с глюкозой. Однако, как уже отмечалось, при использовании сахарозы происходит образование внеклеточной каталазы, которая значительно затрудняет процесс очистки ГО при получении ферментного препарата.

Было проверено влияние комбинированного источника углерода (глюкоза + сахароза, 1:1, 1:2, 2:1) на образование фермента грибом (табл. 2). Установлено, что при использовании такого источника углеродного питания не происходит повышения уровня образования ГО и выявлен сопряженный синтез ГО и каталазы. Поэтому в последующих исследованиях для культивирования *P. varians* БИМ F-563Д использовалась питательная среда, содержащая 7,0 % глюкозы.

Т а б л и ц а 2. Влияние комбинированного источника углерода на рост *P. varians* БИМ F-563Д, синтез ГО и каталазы

Источник С	рН	Биомасса,	ГО		Каталаза
		мг/мл	ед/мл	ед/мг	
Глюкоза, 7 %	3,15	6,03	4,75	0,79	–
Сахароза, 6 %	3,32	7,30	6,06	0,83	++
Глюкоза, 3 % + сахароза 3 %	3,35	6,17	5,88	0,95	+
Глюкоза, 2 % + сахароза 4 %	3,18	6,49	5,51	0,85	+
Глюкоза, 4 % + сахароза, 2 %	3,15	7,37	5,29	0,72	+

Одним из способов повышения продукции ферментов продуцентами является введение в питательную среду эффекторов их синтеза. Выявлены эффекторы синтеза оксидоредуктаз грибами – полисахара и спирты [15–19]. Так, натрий альгинат или пектин повышают уровень образования каталаз *Aspergillus niger* G-IV-10 в 2,8 – 3,0 раза, *P. piceum* БИМ F-371Д – в 4,8 раза [16, 15], а этанол – лакказ *Trametes vesicolor* и *Pycnoporus cinnabarinus* ss3 – в 20 и 155 раз [17–19].

Установлено, что добавление в питательную среду пектина, ксилана или желатина позволяет повысить уровень образования ГО *P. varians* БИМ F-563Д на 44, 34 и 32 %. Использование в среде декстрана, крахмала и хитозана приводит к ингибированию синтеза фермента грибом (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Влияние полисахаридов на рост *P. varians* БИМ F-563Д и синтез ГО

Вариант опыта	рН	Биомасса, мг/мл	ГО, ед/мл	ГО, ед/мг
7 % глюкозы (контроль)	4,1	5,7	4,59	0,81
7 % глюкозы + 0,05% пектина	3,1	6,8	6,62	0,97
7 % глюкозы + 0,05 % ксилана	3,2	11	6,15	0,59
7 % глюкозы + 0,05% желатина	3,4	7,6	6,08	0,8
7 % глюкозы + 0,05% КМЦ	2,8	8,36	4,45	0,53
7 % глюкозы + 0,05% декстрана	3,15	5,9	2,29	0,39
7 % глюкозы + 0,05% крахмала	3,3	11,24	3,66	0,33
7 % глюкозы + 0,05% хитозана	3,4	4,96	1,23	0,25

При изучении влияния спиртов на рост *P. varians* БИМ F-563Д и образование ГО установлено, что этанол (0,1–2,0 %) не влияет на рост продуцента, в то время как бутанол (0,5; 0,75; 1,0 %) ингибирует рост гриба на 30, 60 и 100 % (рис. 2). Уровень образования ГО *P. varians* БИМ F-563Д при культивировании на средах, содержащих 1 % этанола (а) или 0,5 % бутанола (б), повышается на 35 и 50 %.

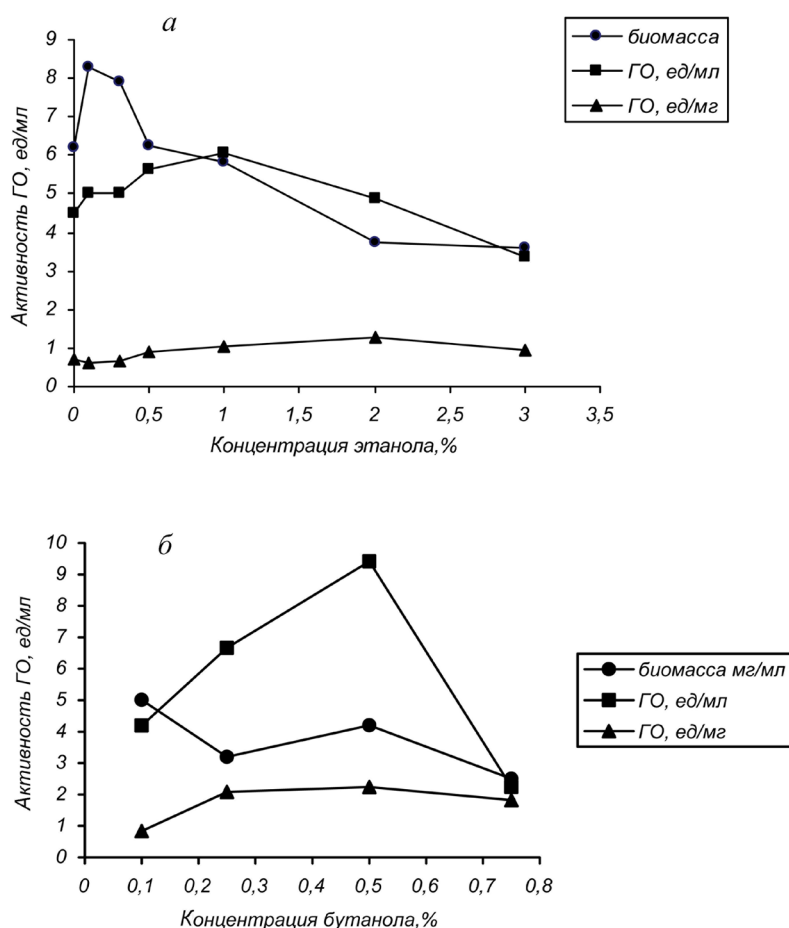


Рис. 2. Влияние спиртов на рост *P. varians* БИМ F-563Д и синтез ГО

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что глюкоза (7 %) и сахароза (6 %) являются оптимальными источниками углерода для образования внеклеточной глюкозооксидазы (ГО) *P. varians* БИМ F-563Д. Введение в питательную среду пектина, ксилана, желатина (0,05 %), а также этанола (1,0 %) и бутанола (0,5 %) обеспечивает повышение уровня образования фермента продуцентом на 44, 34, 32, 35, 50 % соответственно. Выявленные стимуляторы синтеза ГО *P. varians* БИМ F-563Д могут быть использованы при разработке технологии получения ферментного препарата.

Литература

1. Wilson R., Turner A. P. F. // Biosensors Bioelectronics. 1992. Vol. 7, № 2. P. 165–187.
2. Schmid R. D., Karube I. // Biotechnology. 1988. Vol. 6b. P. 317–325.
3. Roehr M., Kubicek Ch. P., Kominek I. // Biotechnology / Ed. by Rehm H. S., Reed G. 1996. Vol. 6. P. 347–362.
4. Bankar S. B., Bule M. V., Singhal R. S., Ananthanarayan L. // Biotechnology Advances. 2009. Vol. 27. P. 489–501.
5. Шахнович Е. В. // Ломоносов – 2012: Материалы конф. молодых ученых. М., 2012. С. 181–182.
6. Фертман Г. Н., Гурц В. Т. // Прикл. биохим. и микробиол. 1969. Т.5, № 5. С.563–566.
7. Cuicu A. // Anal. Lett. 1984. Vol.17. P.1417–1427.
8. Markwell J., Frakes L. G., Brot E. C. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989. Vol.3, № 2. P.166–169.
9. Rogalski J, Fiedurek J, Szczordrak J, Kapusta K, Leonowicz A. // Enzyme Microb. Technol. 1988. Vol. 10. P. 508–11.
10. Hatzinikolaou D. G., Macris B. J. // Enzyme Microb Technol. 1995. Vol. 17. P. 530–534.
11. Petruccioli M., Federici F. // J. Appl. Bacteriol. 1993. Vol. 75. P. 369–372.
12. Михайлова Р. В., Лобанок А. Г., Шишко Ж. Ф., Ясенко М. И. // Микология и фитопатология. 1998. Т. 32, № 1. С. 60–65.
13. Михайлова Р. В., Семашко Т. В., Лобанок А. Г. Прикл. биохим. и микробиол. 2002. Т. 38, № 3. С. 273–277.
14. Kusai K., Sekuzu I., Hagihara B. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1960. Vol. 40. P. 555–557.
15. Михайлова Р. В., Мороз И. В., Лобанок А. Г., Радукан А. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2013. № 1. С. 43–47.

16. Gromada A., Fiedurek J. // J. Basic Microbiol. 1997. Vol. 37, № 2. P. 85–91.
17. In-Young Lee, Kyung-Hee Jung, Choong-Hwaan Lee, Young-Hoon Park // Biotechnol. Lett. 1999. Vol. 21. P. 965–968.
18. Burra S., Bolla K., Nidadavolu S. V. S. S. L. H. B. et al. // Asiatic J. Biotechnol. Resources. 2011. Vol. 2. P. 848–854.
19. Lomascolo A., Record E., Herpoël-Gimbert I. et al. // J. Appl. Microbiol. 2003. Vol. 94. P. 618–624.

R. V. MIKHAILOVA, ZH. F. TSIRKUNOVA, A. G. LOBANOK, E. V. SHAKHNOVICH

**THE DEPENDENCE OF THE BIOSYNTHESIS OF EXTRACELLULAR GLUCOSE OXIDASE
BY *PENICILLIUM VARIANS* FROM CARBON-CONTAINING NUTRIENT
MEDIUM COMPONENTS**

Summary

Influence of carbon-containing compounds on production of extracellular glucose oxidase by *Penicillium varians* BIM F563 D was studied. It was found that glucose (7%) and sucrose (6%) proved the optimal carbon sources for enzyme biosynthesis. Extra supply of pectin, xylan, gelatin (0.05%) and ethanol (1%) or butanol (0.5%) results in increased level of enzyme generation – by 44, 34, 32, 35, 50 %, respectively. The revealed promoters of glucose oxidase synthesis by *Penicillium varians* BIM F563 D may be engaged in elaboration of enzyme production technology.