

УДК 579.22+577.152.1

Р. В. МИХАЙЛОВА, Т. В. СЕМАШКО, А. А. ШЕДЬКО, О. Д. ДЕМЕШКО, А. Г. ЛОБАНОК

**ВЛИЯНИЕ АМФОТЕРИЦИНА НА МОРФОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
PENICILLIUM ADAMETZII – ПРОДУЦЕНТА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ**

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

Изучено влияние стресс-фактора амфотерицина В на морфолого-биохимические свойства промышленного продуцента глюкозооксидазы – *Penicillium adametzii*. Установлено, что в результате действия антибиотика удлиняется время прорастания спор гриба и снижается их жизнеспособность. Введение амфотерицина В ($1,1 \cdot 10^{-8}$ М) в питательную среду в различные фазы роста *P. adametzii* при глубинном культивировании приводит к снижению накопления биомассы и уровня образования глюкозооксидазы. Селекционированы по устойчивости к амфотерицину В ($5,4 \cdot 10^{-6}$ – $2,0 \cdot 10^{-5}$ М) и охарактеризованы морфологические варианты *P. adametzii*. Повышение уровня синтеза глюкозооксидазы на 12,5–88,2 % при глубинном выращивании отмечено у 4 штаммов *P. adametzii* А: 2.19, 5.16, 5.17, 5.18. *P. adametzii* А 5.17 отобран как перспективный продуцент глюкозооксидазы, характеризующийся максимальными значениями уровня образования фермента и продуцирующей способности мицелия.

Ключевые слова: глюкозооксидаза, *Penicillium adametzii*, биосинтез, стресс-фактор, амфотерицин В, селекция, морфологические варианты.

R. V. MIKHAILOVA, T. V. SEMASHKO, H. A. SHEDZKO, O. D. DEMESHKO, A. G. LOBANOK

**EFFECT OF AMPHOTERICIN B ON MORPHOLOGICAL-BIOCHEMICAL PROPERTIES
OF PENICILLIUM ADAMETZII – PRODUCER OF EXTRACELLULAR GLUCOSE OXIDASE**

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences, Minsk, Belarus, e-mail: mikhailovarv@mail.ru

Effect of stress factor amphotericin B on morphological-biochemical properties of industrial glucose oxidase producer – *Penicillium adametzii*. It was found that antibiotic action extends the time of fungal spore generation and reduces their viability. Supply of amphotericin B ($1,1 \cdot 10^{-8}$ M) into the nutrient medium at various stages of *P. adametzii* submerged culture resulted in retarded biomass accumulation and decreased level of glucose oxidase synthesis. Morphological variants of *P. adametzii* were screened for amphotericin B resistance ($5,4 \cdot 10^{-6}$ – $2,0 \cdot 10^{-5}$ M) and characterized.

Enhanced glucose oxidase production (by 12.5–88.2 %) in the course of submerged fermentation was recorded in 4 *P. adametzii* strains: 2.19; 5.16; 5.17; 5.18. *P. adametzii* A 5.17 was chosen as the promising glucose oxidase producer distinguished by maximum values of enzyme generation and productive capacity of the mycelium.

Keywords: Glucose oxidase, *Penicillium adametzii*, biosynthesis, stress factor, amphotericin B, selection, morphological variants.

Введение. В развитии современной биотехнологии одно из ключевых мест занимает биотехнология ферментов, широко используемых в различных отраслях промышленности, медицине и сельском хозяйстве. В настоящее время для повышения рентабельности процессов микробиологического синтеза ферментов разрабатываются различные подходы, среди которых следует выделить воздействие различными типами стрессов на продуценты для улучшения их ростовых характеристик и стимуляции биосинтеза метаболитов [1]. Результатом действия на микроорганизмы активных форм кислорода (АФК) – супероксидного аниона ($O_2^{\cdot-}$), перекиси водорода (H_2O_2), гидроксильного радикала (OH^{\cdot}) и гидроперекиси ($ROOH$) является окислительный стресс [2, 3]. Одним из стресс-факторов, индуцирующих образование АФК и, следовательно, окислительного стресса является амфотерицин В [4–8].

Ранее в Институте микробиологии НАН Беларуси выделен и охарактеризован *Penicillium adametzii* ЛФ F-2044.1 – промышленный продуцент глюкозооксидазы (ГО) (β -D-глюкозо: O_2 -1-оксидоредуктаза, КФ 1.1.3.4), разработан опытно-промышленный регламент получения ферментного

препарата, используемого в производстве отечественных электрохимических датчиков «Глюкосен» для экспресс-анализа глюкозы.

Цель настоящей работы – исследование влияния стресса, вызываемого амфотерицином В, на прорастание спор *Penicillium adametzii* ЛФ F-2044.1, развитие гриба и биосинтез внеклеточной глюкозооксидазы.

Объекты и методы исследования. Объект исследования – *Penicillium adametzii* ЛФ F-2044.1 (далее *P. adametzii*) – продуцент ГО, хранящийся в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов (научной коллекции типовых и промышленно ценных непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси, БИМ F-408 Г).

Глубинное культивирование *P. adametzii* проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды на качалке (180–200 об/мин) в течение 96 ч при 24–26 °С. Питательная среда содержала (%): глюкоза – 6,0, KNO₃ – 0,8, KH₂PO₄ – 0,1, MgSO₄·7H₂O – 0,05, KCl – 0,05, FeSO₄·7H₂O – 0,00005, MnSO₄·5H₂O – 0,00017, экстракт солодовых ростков – 2,0 (исходный pH среды – 5,0). Экстракт солодовых ростков получали по методу Фертман и Гирс [9].

В качестве посевного материала использовали водную суспензию спор гриба в количестве 0,97–1,5·10⁶ спор на 1 мл питательной среды. Подсчет спор проводили в камере Горяева.

Условия стресса моделировали путем введения при посеве *P. adametzii* в жидкую и агаризованную питательные среды амфотерицина В (1,1·10⁻⁸–5,4·10⁻⁶ М). Для изучения влияния кратковременного действия окислительного стресса на развитие *P. adametzii* спорую суспензию гриба (5·10⁶ спор/мл) инкубировали 1 ч или 3 ч с амфотерицином В (1,1·10⁻⁸–2,0·10⁻⁵ М), затем обработанные споры использовали как посевной материал для глубинного культивирования продуцента. Антибиотик также вносился в жидкую питательную среду на следующих фазах развития гриба: прорастания спор (лаг-фаза, 4 ч культивирования), экспоненциального роста (24 ч культивирования) и замедления роста (48 ч культивирования). По окончании культивирования биомассу гриба отделяли путем фильтрования, отмывали дистиллированной водой и определяли ее количество весовым методом. Фильтрат культуральной жидкости (КЖ) использовали для определения глюкозооксидазной активности.

Активность ГО определяли спектрофотометрическим методом [10, 11]. За единицу активности ГО принимали такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкМ бензохинона в гидрохинон за 1 мин при 25 °С. Активность фермента выражали в ед/мл КЖ, ед/мг сухой биомассы (продуцирующая способность мицелия) и в процентах к контролю.

Приведенные в работе результаты экспериментов представляют собой усредненные величины 3–5 опытов. При статистической обработке полученных данных использовали компьютерную программу Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. Полиеновый антибиотик амфотерицин В – эффективное средство в отношении многих патогенных грибов. Он оказывает влияние на рост и деление грибных клеток, образование покоящихся форм, а также обладает способностью увеличивать проницаемость мембран для ионов и индуцировать образование АФК, создавая условия для окислительного стресса [4–9].

Изучение влияния амфотерицина В на развитие *P. adametzii* на агаризованной среде Чапека показало, что при увеличении концентрации антибиотика удлиняется время прорастания спор и снижается их жизнеспособность. Колонии гриба в контроле обнаруживались через 40 ч их выращивания, а на среде с амфотерицином В – через 96–148 ч (в зависимости от вносимой концентрации антибиотика), задержка развития культуры составила 56–108 ч (рис. 1). Отмечено снижение показателя выживаемости спор на 53,3–91,3 %. Минимальное количество жизнеспособных спор (8,7 %) выявлено при выращивании гриба на среде с 5,4·10⁻⁶ М амфотерицина В.

Окислительный стресс может влиять на гидрофобность грибных спор и их адгезивные свойства. Обработка спор гриба амфотерицином В приводит к незначительному и не зависящему от используемой концентрации антибиотика увеличению количества гидрофобных спор (69,27–70,11 %) по сравнению с контролем (64,52 %), индекс гидрофобности составляет 0,98–0,99.

Показано, что в условиях глубинного культивирования *P. adametzii* агрегация спор начинается сразу после посева культуры в жидкую среду со стрессором и без него и достигает стабильно-

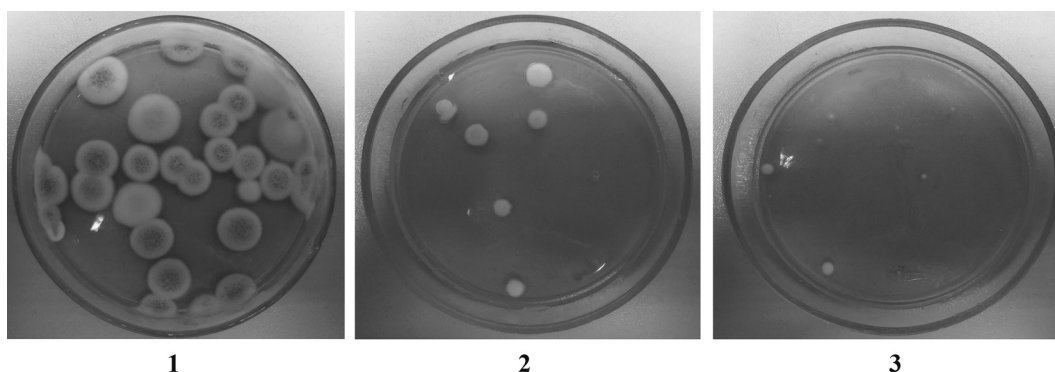


Рис. 1. 7-суточные колонии *P. adametzii* на агаризованной среде Чапека: без добавок (1) и с добавлением в среду амфотерицина В в концентрации $1,1 \cdot 10^{-8}$ М (2) и $1,1 \cdot 10^{-7}$ М (3)

го состояния в течение первых 7 ч выращивания. Повышение концентрации стрессора приводило к уменьшению размеров споровых конгломератов. Через 20 ч ферментации в среде во всех вариантах опыта отмечено наличие сформированных грибных пеллет.

Наличие в среде $1,1 \cdot 10^{-8}$ – $1,1 \cdot 10^{-7}$ М амфотерицина В приводило к снижению накопления биомассы на 30–34 %, а наличие $5,4 \cdot 10^{-6}$ М – к полному подавлению роста культуры. При этом уровень биосинтеза фермента грибом снижался на 1–16 %, а продуцирующая способность повышалась на 26–40 % (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Влияние амфотерицина В на рост *P. adametzii* и на биосинтез глюкозооксидазы

Концентрация амфотерицина В, М	рН	Биомасса		Глюкозооксидаза			
		мг/мл	%	ед/мл	%	ед/мг	%
$1,1 \cdot 10^{-8}$	3,76	$10,91 \pm 0,46$	70	$6,6 \pm 0,23$	99	$0,60 \pm 0,031$	140
$1,1 \cdot 10^{-7}$	3,59	$10,23 \pm 0,41$	66	$5,6 \pm 0,21$	84	$0,54 \pm 0,026$	126
$5,4 \cdot 10^{-6}$	4,28	$0,03 \pm 0,01$		0		0	
Контроль	3,25	$15,6 \pm 0,62$	100	$6,7 \pm 0,27$	100	$0,43 \pm 0,022$	100

Анализ влияния кратковременной (1 и 3 ч) обработки амфотерицином В ($1,1 \cdot 10^{-8}$ – $2,0 \cdot 10^{-5}$ М) спор *P. adametzii* на развитие гриба показал, что время обработки не влияет на скорость их прорастания и на изменение индекса их гидрофобности. Во всех вариантах опыта отмечено снижение жизнеспособности спор гриба на 6–53 %. Минимальное количество жизнеспособных спор выявлено при их 3-часовой обработке $2,0 \cdot 10^{-5}$ М антибиотика. Установлено ингибирование образования ГО грибом на 27–85 % при использовании полученного в условиях стресса спорового посевного материала.

При изучении влияния стрессора ($1,1 \cdot 10^{-8}$ М) на клетки *P. adametzii* различной фазы роста установлено, что независимо от времени внесения антибиотика снижается накопление биомассы и на 5–24 % – уровень образования фермента.

Мицелиальные грибы обладают высоким потенциалом выживания в экстремальных условиях, что частично обусловлено их способностью к вариативности. Проведенная селекция *P. adametzii* по устойчивости к амфотерицину В показала, что при наличии в среде $1,1 \cdot 10^{-5}$ М и $2,0 \cdot 10^{-5}$ М антибиотика гриб представлен одним морфологическим вариантом, а при наличии $5,4 \cdot 10^{-6}$ М – тремя (рис. 2). Полученные штаммы отличались по морфологическим признакам колоний: у *P. adametzii* А 5.16 – серовато-белые, круглые, выпуклые шерстистые колонии с ровными краями и белой серединой; у *P. adametzii* А 5.17 – белые, круглые, плоские пушистые колонии с белой с ярко-желтым экссудатом серединой и ровными, серовато-белыми краями; у *P. adametzii* А 2.19 – белые, круглые, выпуклые шерстистые колонии с вкраплениями желтого экссудата и неровными краями.

Анализ роста морфологических вариантов *P. adametzii* и биосинтеза ими ГО в глубинной культуре показал, что они накапливали 6,25–10,00 мг/мл биомассы. Исследуемые варианты

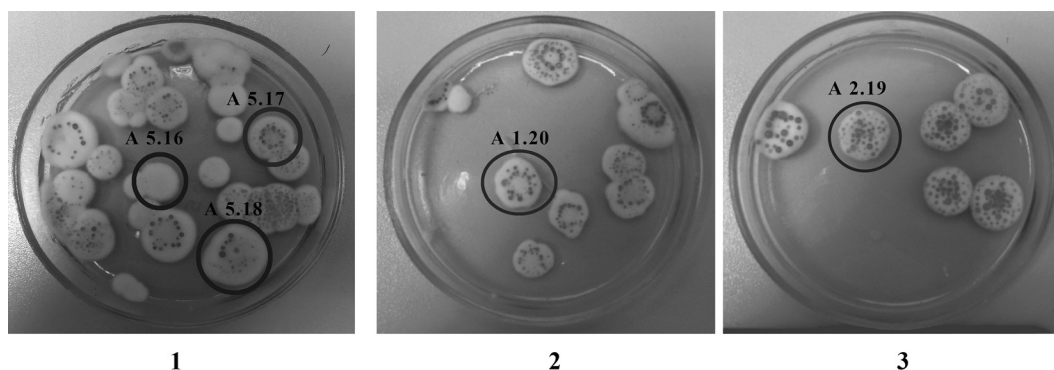


Рис. 2. Морфологические варианты *P. adametzii*, образуемые на агаризованной среде Чапека с $5,4 \cdot 10^{-6}$ М (1), $1,1 \cdot 10^{-5}$ М (2) и $2,0 \cdot 10^{-5}$ М (3) амфотерицина В

P. adametzii синтезировали 0,2–16,0 ед/мл ГО (табл. 2). Повышенным уровнем образования фермента (на 12,9–88,2 %) и продуцирующей способности мицелия (на 57,0–171,3 %) характеризовались все варианты гриба, кроме *P. adametzii* А 1.20, селекционированного по устойчивости к $2,0 \cdot 10^{-5}$ М амфотерицина В. По вариабельности продуцирующей способности мицелия лучшими показателями отличались *P. adametzii* А 5.16, А 5.17, А 2.19 (коэффициент вариации составил 9,2; 19,9; 13,9 %).

Т а б л и ц а 2. Анализ способности морфологических вариантов *P. adametzii* синтезировать глюкозооксидазу

Вариант <i>P. adametzii</i>	рН	Глюкозооксидаза					
		ед/мл	%	коэффициент вариации, %	ед/мг	%	коэффициент вариации, %
А 5.16	3,6	10,3 ± 1,8	121,2	17,1	1,1 ± 0,1	157,1	9,2
А 5.17	3,5	16,0 ± 6,4	188,2	39,7	1,9 ± 0,4	271,4	19,9
А 5.18	3,5	10,0 ± 5,8	117,6	58,4	1,6 ± 0,7	228,6	40,7
А 1.20	4,4	0,2 ± 0,2	2,4	116,9	0,02 ± 0,02	2,9	88,1
А 2.19	3,5	9,6 ± 2,2	112,9	22,8	1,5 ± 0,2	214,3	13,9
Контроль	3,4	8,5 ± 3,3	100,0	38,9	0,7 ± 0,3	100,0	36,2

Заклучение. Таким образом, исследовано влияние амфотерицина В на морфолого-биохимические свойства *P. adametzii*. Установлено, что в результате действия антибиотика удлиняется время прорастания спор гриба и снижается их жизнеспособность. Действие амфотерицина В ($1,1 \cdot 10^{-8}$ М) на клетки *P. adametzii* различной фазы роста приводит к снижению накопления биомассы, а также уровня образования ГО. Селекционированы по устойчивости к $5,4 \cdot 10^{-6}$ – $2,0 \cdot 10^{-5}$ М амфотерицина В и охарактеризованы морфологические варианты *P. adametzii*. Повышение уровня синтеза ГО на 12,9–88,2 % в условиях глубинного культивирования отмечено у 4 полученных штаммов. *P. adametzii* А 5.17 отобран как перспективный продуцент ГО, характеризующийся максимальными значениями уровня образования фермента и продуцирующей способности мицелия.

Список использованной литературы

1. Kouznetsov, A. Ye. Simultaneous hybrid processes as a way to improve characteristics of cultivation of micro-organisms and biodestruction of pollutants / A. Ye. Kouznetsov, S. V. Kalyonov // New Res. on the Environment and Biotechnol. – New York: Nova Science Publishers Inc., 2006. – P. 99–104.
2. Li, Q. Oxidative stress in industrial fungi / Q. Li, L. M. Harvey, B. McNeil // Crit. Rev. Biotechnol. – 2009. – Vol. 29, N 3. – P. 199–213.
3. Белозерская, Т. А. Активные формы кислорода и стратегия антиоксидантной защиты у грибов / Т. А. Белозерская, Н. Н. Гесслер // Прикл. биохим. и микробиол. – 2007. – Т. 43, № 5. – С. 565–578.
4. Касумов, Х. М. Современные представления о механизме действия полиеновых антибиотиков – взаимосвязь между структурой и функцией / Х. М. Касумов // Антибиотики. – 1981. – Т. 26, № 2. – С. 143–155.

5. Sokol-Anderson, M. L. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans* / M. L. Sokol-Anderson, J. Brajtburg, G. Medoff // J. Infect. Dis. – 1986. – Vol. 154. – P. 76–83.
6. Phillips, A. J. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans* / A. J. Phillips, I. Sudbery, M. Ramsdale // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2003. – Vol. 100. – P. 14327–14332.
7. Cohen, B. E. Amphotericin B membrane action: role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects / B. E. Cohen // J. Membrane Biol. – 2010. – Vol. 238. – P. 1–20.
8. Belenky, P. Fungicidal drugs induce a common oxidative-damage cellular death pathway / P. Belenky, D. Camacho, J. J. Collins // Cell Reports. – 2013. – Vol. 3. – P. 350–358.
9. Фертман, Г. Н. Аминокислотный и углеводный состав экстрактов из солодовых ростков / Г. Н. Фертман, В. Т. Гирс // Прикл. биохим. и микробиол. – 1969. – Т. 5, № 5. – С. 563–566.
10. Cuicu, A. Fast spectrometric method of determining the activity of glucose oxidase / A. Cuicu, C. Patroescu // Anal. Lett. – 1984. – Vol. 17. – P. 1417–1427.
11. *Aspergillus niger* mutants with increased glucose oxidase production / L. Markwell [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1989. – Vol. 3, N 2. – P. 166–169.

Поступила в редакцию 14.12.2015