

УДК 579.22+577.152.1

Р. В. МИХАЙЛОВА¹, А. Г. ЛОБАНОК¹, Л. А. ГОЛОВЛЕВА², Ж. Ф. ЦИРКУНОВА¹, Е. В. ШАХНОВИЧ¹**БИОСИНТЕЗ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ *PENICILLIUM VARIANS*
В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА**¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: mikhailovarv@mail.ru,²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Москва,
e-mail: golovleva@ibpm.pushchino.ru

(Поступила в редакцию 30.01.2014)

Введение. Жизнедеятельность мицелиальных грибов, как в естественных условиях, так и при искусственном выращивании, проходит под воздействием физических, химических, биологических факторов, которые могут оказывать стрессовое действие, приводящее к изменению физиолого-морфологических и биохимических свойств культур. Грибы рода *Penicillium*, как и все аэробно растущие микроорганизмы, используют молекулярный кислород в качестве акцептора электронов в процессе дыхания. При окислении кислорода генерируются его активные формы (АФК) – супероксидные и гидроксильные радикалы, пероксид водорода, синглетный кислород и др. Высокорекреационные АФК оказывают на клетки всех типов токсическое и мутагенное действие, вызывают окислительные повреждения ДНК, белков и мембранных липидов. Превышение генерации АФК над способностью клетки к их нейтрализации вызывает состояние окислительного стресса [1–4]. Действие стресс-факторов может привести к изменению ростовых характеристик микроорганизмов и показателей биосинтеза метаболитов. Поэтому стресс-факторы и стресс-сопротекторы могут быть использованы для разработки биотехнологий получения практически ценных метаболитов грибов, к которым относятся ферменты, в том числе и глюкозооксидаза (ГО).

ГО (β -D-глюкозо: O2-1-оксидоредуктаза, КФ 1.1.3.4) катализирует окисление β -D-глюкозы до β -D-глюконо- δ -лактона и пероксида водорода. Фермент востребован в клинической диагностике, химической и пищевой промышленности [5–8]. Ранее, в результате скрининга отобран *Penicillium varians* – высокоактивный продуцент ГО, который депонирован в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов как *Penicillium varians* БИМ F-563 Д.

Цель настоящей работы – исследование влияния окислительного стресса на рост *P. varians* БИМ F-563 Д и образование внеклеточной ГО.

Объекты и методы исследования. Объект исследования – *P. varians* БИМ F-563Д – продуцент ГО, хранящийся в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов (научной коллекции типовых и промышленно ценных непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси). Культивирование гриба 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 (%): KNO_3 – 0,8; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; KCl – 0,05; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,00005; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,00017, экстракт солодовых ростков – 2,0, глюкоза – 6. Экстракт солодовых ростков получали по методу Фертман и Гирс [9].

Посевным материалом служила водная споровая суспензия ($0,1$ – $0,2 \cdot 10^6$ спор/мл), полученная после выращивания *P. varians* БИМ F-563Д на агаризованной среде Чапека в течение 14 сут 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.

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) и в процентах к контролю.

Условия окислительного стресса создавали выращивая гриб на агаризованной среде Чапека, содержащей 0,2–2,0 мМ H₂O₂. При глубинном культивировании H₂O₂ вносили в питательную среду перед посевом культуры (0,5–6,5 мМ) и на 3-е сутки роста (0,5–2,0 мМ).

Приведенные в работе результаты экспериментов представляют собой усредненные величины 3–5 опытов. При статистической обработке полученных данных использовали компьютерную программу Microsoft Excel [12].

Результаты и их обсуждение. При изучении влияния окислительного стресса на рост *P. varians* БИМ F-563Д и биосинтез ГО пероксид водорода вводили в питательную среду на этапах глубинного культивирования гриба и получения посевного материала.

Установлено, что введение H₂O₂ (0,5–5,5 мМ) в питательную среду перед посевом продуцента приводит к снижению образования биомассы на 39–86,6 % и продукции фермента на 19–83,8 %. Летальная концентрация H₂O₂, при которой происходит полное подавление роста гриба, составляет 6,5 мМ.

Известно, что ГО относится к вторичным метаболитам, которые синтезируются в стационарной фазе роста грибов. В связи с этим было изучено влияние пероксида водорода (1 мМ), внесенного на 3-е сутки культивирования, на биосинтез ГО продуцентом (табл.1). Выявлено снижение показателей ферментационного процесса: накопления биомассы – на 30 %, количества внеклеточного фермента в КЖ – на 66 %, продуцирующей способности мицелия – на 53 %.

Т а б л и ц а 1. Влияние окислительного стресса на рост *P. varians* БИМ F-563Д и образование ГО в зависимости от времени внесения H₂O₂ в питательную среду

Время внесения 1 мМ H ₂ O ₂	pH	Биомасса, мг/мл	ГО, ед/мл	ГО, ед/мг
Контроль	3,2	5,88	4,56	0,78
Перед посевом	3,2	3,44	3,59	1,03
На 3-е сутки роста	3,3	4,16	1,54	0,37

Литературные данные свидетельствуют о том, что устойчивость микроорганизмов к стрессовым факторам может быть повышена предобработкой клеток стрессорами. Так, выживаемость *Yarrowia lipolytica* и *Saccharomyces cerevisiae* в условиях различных видов стресса в результате предобработки клеток нелетальными дозами стрессоров была повышена на 18–35 % [3, 13]. Такая предобработка приводит также к перекрестной адаптации, когда один вид стресса способен индуцировать развитие устойчивости к другим видам стрессорных воздействий.

Установлено, что использование споровой суспензии, полученной после роста гриба на агаризованной среде Чапека, содержащей дополнительно 0,2–2,0 мМ H₂O₂, никак не повлияло на последующий рост продуцента и образование ГО при глубинном культивировании на питательной среде без стрессора. Однако использование посевного материала, полученного после роста *P. varians* БИМ F-563Д на агаризованной среде Чапека с 0,24 мМ H₂O₂, приводит к адаптации гриба к более высоким дозам стрессора при последующем глубинном культивировании в условиях окислительного стресса. При выращивании адаптированного продуцента на средах, содержащих 0,5 мМ, 1,0 и 2,0 мМ H₂O₂, не только не происходит ингибирование роста продуцента и образования им ГО, но отмечено стимулирование указанных процессов, независимое от времени внесения стрессора в среду (рис. 1 и 2, б). Так, при добавлении пероксида водорода (1,0 мМ) в питательную среду на 3-е сутки роста гриба происходит увеличение уровня образования биомассы на 29 %, фермента – на 31 %, продуцирующей способности мицелия – на 24 % (рис. 2, б).

Показано, что предварительное действие этанола (2 %) на посевной материал приводит к повышению устойчивости *P. varians* БИМ F-563Д к окислительному стрессу, что выявляется в увеличении накопления биомассы и уровня образования ГО (рис. 1 и 2, в). Индукция этанольным

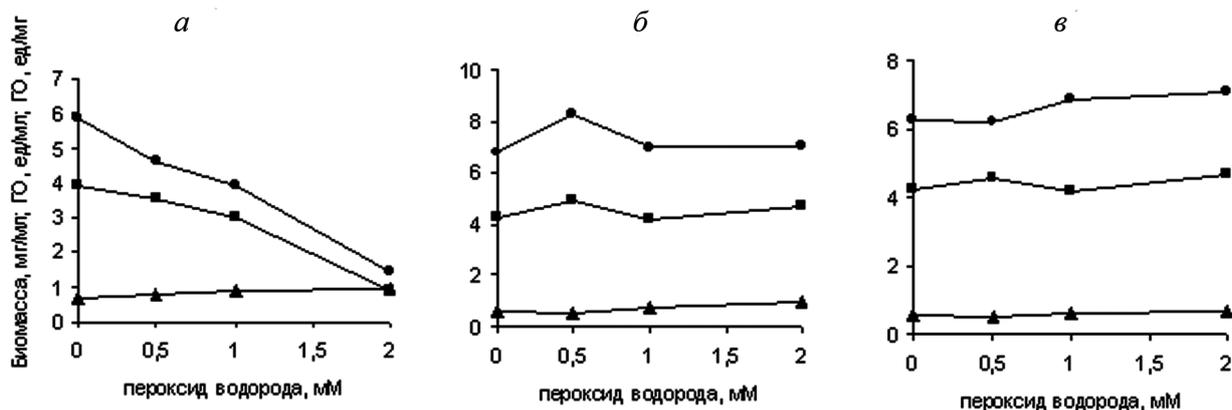


Рис. 1. Влияние предадаптации посевного материала к стрессорам (H_2O_2 , этанол) на рост *P. varians* БИМ F-563Д и образование ГО в условиях окислительного стресса. В опытах H_2O_2 вносили в питательную среду перед посевом культуры, использовали споровую суспензию, полученную после роста гриба на среде Чапека (а), на среде Чапека + 0,24 мМ H_2O_2 (б) и на среде Чапека + 2 % этанола (в): ■ – ГО, ед/мл; ▲ – ГО, ед/мг; ● – биомасса, мг/мл (то же для рис. 2)

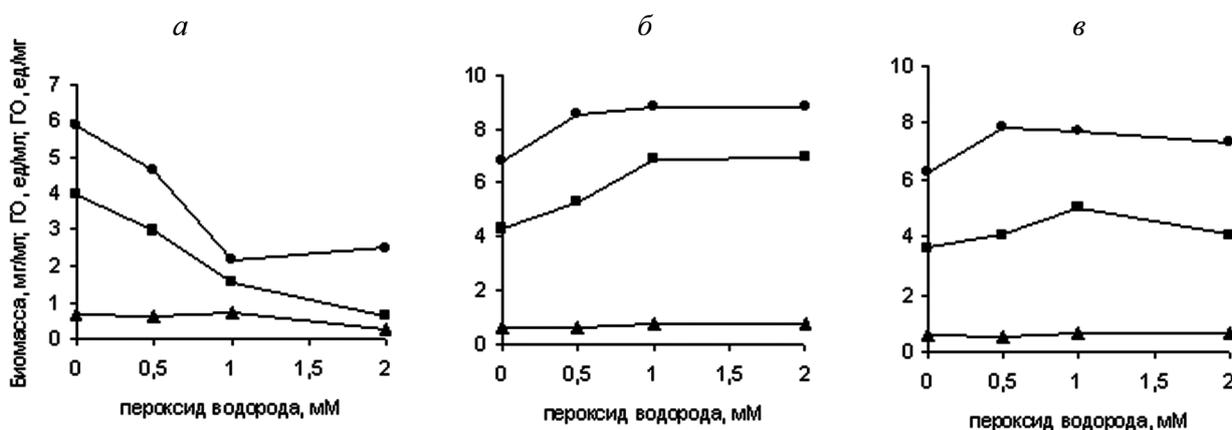


Рис. 2. Влияние предадаптации посевного материала к стрессорам (H_2O_2 , этанол) на рост *P. varians* БИМ F-563Д и образование ГО в условиях окислительного стресса. В опытах H_2O_2 вносили в питательную среду на 3-е сутки роста культуры, использовали споровую суспензию, полученную после роста гриба на среде Чапека (а), на среде Чапека + 0,24 мМ H_2O_2 (б) и на среде Чапека + 2 % этанола (в)

Т а б л и ц а 2. Влияние температурной обработки посевного материала на устойчивость *P. varians* БИМ F-563Д к 2 мМ пероксида водорода

Температура обработки посевного материала, °С	рН	Биомасса, мг/мл	ГО, ед/мл	ГО, ед/мг
30	3,3	2,06	1,34	0,65
40	3,3	2,05	1,20	0,58
50	3,4	2,16	0,37	0,17
60	3,65	1,14	0,12	0,10
Контроль *	3,2	1,44	0,9	0,62

*В качестве контроля использовался посевной материал без температурной обработки.

стрессом устойчивости к окислительному стрессу *P. varians* БИМ F-563Д свидетельствует о наличии у гриба способности к перекрестной адаптации (кросс-толерантности).

Установленный факт подтверждается в опытах с использованием посевного материала, подвергнутого температурному стрессу. Из данных, представленных в табл. 2, видно, что предварительное часовое инкубирование посевного материала (споровой суспензии) *P. varians* БИМ F-563Д при 30 и 40 °С индуцирует развитие устойчивости к окислительному стрессу. В условиях

окислительного стресса (2,0 мМ H₂O₂) отмечено повышение накопления биомассы гриба на 43 % и уровня образования ГО на 49 и 33 %.

Заключение. В результате проведенных исследований изучено влияние окислительного стресса на рост *P. varians* БИМ F-563Д и биосинтез ГО. Установлено, что введение H₂O₂ (0,5–5,5 мМ) в питательную среду перед посевом продуцента приводит к снижению образования биомассы на 39–86,6 % и продукции фермента на 19–83,8 %. Летальная концентрация H₂O₂, при которой происходит полное подавление роста гриба, составляет 6,5 мМ. Показано ингибирующее действие окислительного стресса на рост *P. varians* БИМ F-563Д и биосинтез ГО в стационарной фазе роста гриба. Устойчивость *P. varians* БИМ F-563Д к окислительному стрессу может быть повышена в результате обработки посевного материала нелетальными дозами стрессора (H₂O₂). Установлено явление кросс-толерантности у *P. varians* БИМ F-563Д: предварительное воздействие этанольного и температурного стрессов на посевной материал приводит к повышению устойчивости гриба к окислительному стрессу.

Литература

1. Li Q., Harvey L. M., McNeil B. // Crit. Rev. Biotechnol. 2009. Vol. 29, №3. P. 199–213.
2. Белозерская Т. А., Гесслер Н. Н. // Прикл. биохим. микробиол. 2007. Т. 43, №5. С. 565–578.
3. Ежова Г. П., Аринбасарова А. Ю., Смирнов В. Ф., Гусева Е. В. // Вестн. Нижегородского ун-та им. Н. И. Лобачевского. 2010. №6. С. 113–118.
4. Imlay J. A., Chin S. M., Lin S. // Science. 1988. Vol. 240, №4852. P. 640–642.
5. Raba J., Mottola H. A. // Crit. Rev. Analyt. Chemistry. 1995. Vol. 25, №1. P. 1–42.
6. Crueger A., Crueger W. // Microbial Enzymes and Biotechnology. / Eds W.M. Fogarty and C. T. Kelly. London, New York: Elsevier Applied Science Publishers. 1990. P. 177–226.
7. Wilson R., Turner A. P. F. // Biosensors Bioelectronics. 1992. Vol. 7, №2. P. 165–187.
8. Godjevargova T., Dayal R., Turmanova S. // Macromol. Biosci. 2004. Vol. 4, №10. P. 950–956.
9. Фертман Г. Н., Гурц В. Т. // Прикл. биохим и микробиол. 1969. Т. 5, №5. С. 563–566.
10. Cuicu A. // Anal. Lett. 1984. Vol. 17. P. 1417–1427.
11. Markwell J., Frakes L. G., Brot E. C. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989. Vol. 3, №2. P. 166–169.
12. Тюпин Ю. Н., Макаров А. А. Статистический анализ данных на компьютере. М., 1998.
13. Ruis H., Schuller C. // Bioassays. 1995. Vol. 17. P. 959–965.

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

BIOSYNTHESIS OF EXTRACELLULAR GLUCOSE OXIDASE BY *PENICILLIUM VARIENS* EXPOSED TO OXIDATION STRESS

Summary

Effect of oxidation stress on growth of *P. varians* BIM F 563 D and biosynthesis of extracellular glucose oxidase was studied. It was found that supply of H₂O₂ (0.5–5.5 mM) into the nutrient medium before inoculation resulted in reduced biomass accumulation by 39–86.6 % and decreased level of enzyme generation – 19–83.8 %. Inhibitory impact of oxidation stress on growth of *P. varians* BIM F 563 D and glucose oxidase biosynthesis at stationary phase of fungal culture was demonstrated. Resistance of *P. varians* BIM F 563 D to oxidation stress may be promoted by treatment inoculum with non-lethal doses of stress factor. Phenomenon of cross tolerance was established in *P. varians* BIM F 563 D: preliminary exposure of seed material to temperature and ethanolic stress raised fungal resistance to oxidation stress.