

Биосинтез противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma* spp.

И. П. СМЕРНОВА, С. Б. АЛЕКСЕЕВ, А. А. ШЕВЧЕНКО

Российский университет дружбы народов, Москва

Biosynthesis of L-Lysine- α -Oxidase, an Antitumor Enzyme, by *Trichoderma* spp.

I. P. SMIRNOVA, S. B. ALEKSEEV, A. A. SHEVCHENKO

Russian University of Peoples' Friendship, Moscow

Изучены штаммы триходермы, являющиеся продуцентами фермента L-лизин- α -оксидазы, перспективного в химиотерапии злокачественных опухолей. Показано, что наилучший биосинтез фермента происходит на среде с пшеничными отрубями. При разной кислотности реакционной среды у штаммов проявляется разный спектр L-аминоксидазных активностей. Наибольшую активность штаммы проявляли в отношении деградации L-лизина. Продуцент L-лизина *Brevibacterium* sp. индуцирует L-лизин- α -оксидазную активность *Trichoderma* spp.

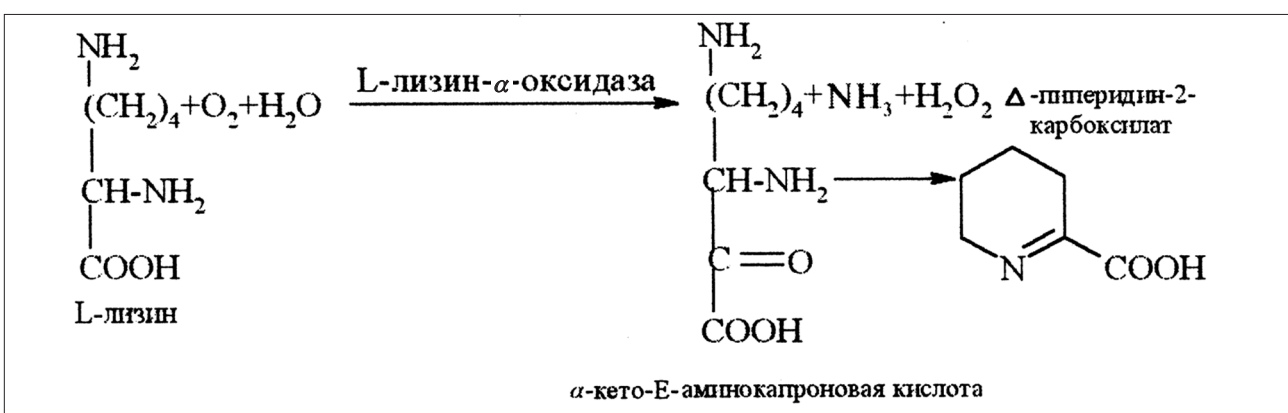
Ключевые слова: *Trichoderma* spp., биосинтез, L-лизин- α -оксидаза.

Strains of *Trichoderma* spp., producing L-lysine- α -oxidase, prospective in chemotherapy of malignant tumors, were studied. The best results of the enzyme biosynthesis were observed on the wheat bran medium. When grown on the media with various pH levels, the strains showed different spectra of the L-aminooxidase activity. The highest activity of the strains was recorded with respect to destruction of L-lysine. The lysine-producing organism *Brevibacterium* sp. induced L-lysine- α -oxidase activity in *Trichoderma* spp.

Key words: *Trichoderma* spp., biosynthesis, L-lysine- α -oxidase.

Оксидаза, вызывающая деградацию L-лизина, была впервые обнаружена у *Trichoderma viride* Pers ex S. F. Grey японскими исследователями [1], а несколько позже — у *Trichoderma* spp. в России, на кафедре биохимии РУДН [2, 3]. Фермент катализирует реакцию окислительного деаминации L-лизина по следующей схеме:

нимой аминокислоты L-лизина, входящей в состав лизоцима, сывороточного альбумина, РНК-азы, инсулина, миоглобина, пепсина и других белков. Было показано, что фермент может быть использован как противоопухолевое средство, как иммуномодулятор, а также он обладает антивирусными и антимикробными свойствами [4—13].



Значение этого фермента обусловлено тем, что с помощью него происходит деградация незаме-

Цель настоящей работы — изучение некоторых факторов биосинтеза фермента L-лизин- α -оксидазы, перспективного для химиотерапии.

Материал и методы

В опытах использовали штаммы рода *Trichoderma* поскольку активные продуценты L-лизин- α -оксидазы были найдены среди

© Коллектив авторов, 2009

Адрес для корреспонденции: 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6. РУДН

Таблица 1. Рост и образование L-лизин- α -оксидазы различными штаммами рода *Trichoderma* (8-е сутки роста)

Вид гриба	Рост	Активность, Е/мл
<i>T.viride</i> Pers ex S.F.Grey	+	14,2
<i>T.harzianum</i> Rifai	+	15,6
<i>T.lignorum</i>	—	0
<i>T.koningii</i> Oud. BKMF-484	—	0
<i>T.koningii</i> Oud. BKMF-485	+	0
<i>T.koningii</i> Oud. BKMF-1283	+	0
<i>T.koningii</i> Oud. BKMF-2111	—	0
<i>T.viride</i> Pers ex S.F.Grey BKMF-426	+	0
<i>T.viride</i> Pers ex S.F.Grey BKMF-1117	+	6,8
<i>T.viride</i> Pers ex S.F.Grey BKMF-2113	+	0
<i>T.longibrachiatum</i> Rifai BKMF-2025	+	6,0
<i>T.aureoviride</i> Rifai BKMF-2026	—	0
<i>T.aureoviride</i> Rifai BKMF-2007	+	12,2
<i>T.hamatum</i> (Bon.)Sooc. BKMF-2008	—	0
<i>T.harzianum</i> Rifai BKMF-2029	—	0
<i>T.harzianum</i> Rifai BKMF-2110	—	0
<i>T.pseudokoningii</i> Rifai BKMF-2112	—	0
<i>Trichoderma</i> sp. BKMF-2030	—	0

Примечание. «+» — наличие роста; «—» — отсутствие роста или слабый рост.

Таблица 2. Образование L-лизин- α -оксидазы штаммом № 2 триходермы при разных способах выращивания (5-е сутки)

Способ выращивания	pH среды	Белок, мкг/мл	Активность, Е/мл
Глубинный	6,2	260	1,2
Стационарный	6,7	232	3,3
Поверхностный	6,0	420	4,8

представителей этого рода [1]. Посевным материалом служил вегетативный мицелий грибов, выращенный в течении 8—10 сут при 28°C на среде Чапека. Культивирование проводили глубинным способом с использованием лабораторного встряхивателя № 357 (Poland) и поверхностным способом.

При изучении L-лизин- α -оксидазной активности в качестве фоновой среды служила ранее предложенная среда [1], в состав которой вносились добавки различных источников в эквивалентных количествах по углероду и азоту (0,9 и 1,4 г углерода и азота соответственно на 100 г среды).

Опыты по изучению субстратной специфичности штаммов рода *Trichoderma* при разных значениях pH реакционной смеси проводились с добавлением ацетатного буфера (pH 5,0) и глицин-HCl буфера pH 8,0.

Активность L-лизин- α -оксидазы в культуральной жидкости *Trichoderma* рассчитывали по приросту H_2O_2 , количество которой определяли спектрофотометрическим ортодианизидиновым микрометодом [2]. Сущность метода заключается во взаимодействии всей образующейся в реакции H_2O_2 с О-дианизидингидрохлоридом с развитием соответствующей окраски. Инкубационная смесь содержала 20 мкг пероксидазы, 250 мкг О-дианизидингидрохлорида и 0,1—0,5 мг белка в 1 мл конечного объема. После инкубирования в термостате в течение 20 мин при 37°C пробы охлаждали до 0—4°C. Оптическую плотность окрашенных растворов опытной и контрольной (без субстрата) проб измеряли на спектрофотометре СФ-16 при 540 нм, в качестве контрольной пробы (без пероксидазы).

Для построения калибровочной кривой молярность свежеприготовленного раствора H_2O_2 определяли перманганатометрией. Субстратами 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 — О-дианизидингидрохлорид (Merck, Германия). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль H_2O_2 за 1 мин при 37°C.

Удельную активность фермента выражали числом единиц активности на 1 мг белка или 1 мл культуральной жидкости. Белок определяли по методу Лоури [14]. В качестве стандарта использовали 0,05%-ный раствор кристаллического бычьего альбумина (Reanal, Венгрия).

Результаты и обсуждение

Исследован рост на среде Soda [1] и образование L-лизин- α -оксидазы различными штаммами рода *Trichoderma* (табл. 1). Способность к деструкции L-лизина проявляли штаммы *T.viride* Pers ex S. F. Grey, *T.harzianum* Rifai, *T.viride* Pers ex S. F. Grey BKMF-1117, *T.longibrachiatum* Rifai BKMF-2025, *T.aureoviride* Rifai BKMF-2007. Как видно из приведённых результатов, не было обнаружено корреляции роста на среде с пшеничными отрубями и биосинтезом фермента. Видимо, это объясняется различной способностью грибов использовать пшеничные отруби в качестве источника углерода.

В дальнейших экспериментах нами проведено сравнительное изучение различных способов выращивания культуры грибов с целью выяснения оптимальных условий для биосинтеза L-лизин- α -оксидазы (табл. 2).

Проведённое исследование показало, что наилучший способ биосинтеза фермента — это поверхностный способ выращивания гриба. При стационарном способе выращивания активность L-лизин- α -оксидазы была несколько ниже.

Таблица 3. Изменения субстратной специфичности штаммов рода *Trichoderma* при разных значениях pH реакционной смеси (8-е сутки роста)

Субстрат*	Штамм № 2		Штамм № 13	
	рН буфера			
	5,0	8,0	5,0	8,0
Акт. по лизину, Е/мл				
DL-лизин	100%	100%	100%	100%
DL-фенилаланин	8,6%	2,0%	5,6%	6,8%
L-гистидин	0	0	7,4%	5,2%
L-аргинин	0	13,1%	2,0%	22,0%
DL-метионин	0,7%	0	2,4%	3,7%
L-глутамин	0	0	1,5%	0,8%

Примечание. * — штаммы № 2, № 13 не проявляли оксидазной активности в отношении аминокислот: валина, треонина, серина, триптофана, аланина, пролина, цистеина, аспарагина, аспартата, изолейцина, тирозина, глицина, глутамата, лейцина.

Таблица 4. Образование L-лизин- α -оксидазы штаммом *Trichoderma* в зависимости от длительности выращивания на твёрдой питательной среде с пшеничными отрубями

Сутки роста	pH экстракта	Белок, мкг/мл	Активность, Е/мл	Активность, Е/мг
5-е	6,0	420	4,8	0,31
6-е	6,3	354	18,0	0,51
7-е	6,4	300	12,8	0,43
8-е	6,5	264	17,3	0,65
12-е	6,7	—	17,1	0,20

Таблица 5. Влияние источников углерода на L-лизин- α -оксидазную активность *Trichoderma* sp. (глубинное культивирование)

Источник углерода	pH-среды						Белок, мг/мл						Активность, Е/мл					
	сутки роста						сутки роста						сутки роста					
	0	3	4	5	6	7	0	3	4	5	6	7	0	3	4	5	6	7
Сложный источник углерода*(контроль)	6,0	8,1	8,1	7,9	7,8	5,5	0	0,5	0,6	0,7	0,6	0,9	0	3,9	3,8	3,5	3,4	1,6
Глицерин	6,0	5,8	5,9	5,1	5,2	4,5	0	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0	2,1	1,5	0	0	0
Лактоза	6,0	5,9	6,0	6,3	6,0	5,5	0	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0	1,8	1,9	2,5	2,0	0
Этанол	6,0	5,6	6,2	6,0	5,1	5,0	0	0,3	0,4	0,5	0,4	0,4	0	1,5	2,1	0,9	0	0

Примечание. * — пшеничные отруби.

Известно, что скорость любой ферментативной реакции зависит от pH реакционной среды. Поэтому, логичным было исследование субстратной специфичности оксидаз L-аминокислот штаммов *Trichoderma* при разных значениях pH реакционной среды. С этой целью были отобраны два штамма, активные в отношении деструкции L-лизина: *T.aureoviride* Rifai и *T.harzianum* Rifai.

Наибольшая оксидазная активность была в отношении L-лизина, однако в количественном и качественном отношении были существенные различия (табл. 3).

Таким образом, при отборе штамма-продуцента фермента L-лизин- α -оксидазы с наиболее высокой субстратной специфичностью необходимо учитывать pH реакционной среды, так как специфичность в отношении деструкции разных аминокислот проявляется в неодинаковой степени при разном значении pH у разных штаммов.

Далее исследовали изменение активностей оксидаз L-аминокислот в зависимости от возраста культуры *Trichoderma* spp. Было отмечено, что с возрастом культуры расширялся спектр деструкции аминокислот, однако, как и в предыдущем

эксперименте, в отношении аминокислоты лизина оксидазная активность всегда была наибольшей (см. табл. 3).

Для продуцента L-лизин- α -оксидазы *T.viride* V 244-2 [1] известно, что максимальное образование фермента на твёрдой питательной среде с пшеничными отрубями наблюдалось на 14-е сутки роста культуры.

Исследование динамики биосинтеза L-лизин- α -оксидазы активным продуцентом *Trichoderma* sp. (отечественный штамм) показало возможность максимального образования фермента на 8-е сутки роста культуры (табл. 4).

Однако, изучать регуляцию биосинтеза фермента целесообразно, по известным причинам, на искусственной среде. Поэтому в дальнейших исследованиях мы предприняли попытку заменить используемые в качестве источника углерода пшеничные отруби на более простые компоненты (табл. 5).

Как видно из табл. 5, среды с использованием в качестве источника углерода глицерина, лактозы, этанола не являлись оптимальными субстратами для штамма и L-лизин- α -оксидазная актив-

Таблица 6. Изучения динамики биосинтеза фермента в зависимости от продолжительности хранения посевного материала

Длительность хранения посевного материала	рН-среды					Активность L-лизин- α -оксидазы, Е/мл				
	сутки роста					сутки роста				
	0	4	5	6	7	0	4	5	6	7
10 сут (контроль)	6,0	8,1	8,0	7,9	5,5	0	1,9	1,8	1,8	1,9
120 сут	6,0	5,8	5,7	6,6	7,9	0	0	0,2	1,5	2,3

Таблица 7. Влияние биологически активных добавок на L-лизин- α -оксидазную активность *Trichoderma* sp. (4-е сутки роста)

Биологически активная добавка*	Активность L-лизин- α -оксидазы, Е/мл
Контроль (без добавок)	3,5
β -индолилуксусная кислота	4,3
6-Бензиламинопурин	3,6
Гибберелловая кислота	3,9
L-лизин	4,8
L-лизин, L-фенилаланин, L-метионин	4,9
Стерильная культуральная жидкость <i>Brevibacterium</i> sp. — продуцент L-лизина	9,5

Примечание. * — вещества добавлялись в одинаковых количествах, кроме стерильной культуральной жидкости *Brevibacterium* sp. — продуцента L-лизина.

ность проявлялась в значительно меньших количествах по сравнению с использованием в среде с пшеничных отрубей.

Максимальное образование фермента на среде с трудноусвояемым субстратом глицерином происходило на 3-и, на среде с лактозой — на 5-е, на среде с этанолом — на 4-е сутки роста. Очевидно, что эти среды не могут быть использованы для накопления фермента в достаточном количестве. Максимальное образование фермента происходит на среде с использованием в качестве источника углерода пшеничных отрубей на 3—4-е сутки роста гриба.

Исследование динамики биосинтеза L-лизин- α -оксидазы в зависимости от сроков хранения посевного материала показало, что даже длительное хранение (120 сут) не снижает активности фермента в ферментационной среде (табл. 6). Однако биосинтез фермента начинается только к шестым суткам роста и превышает активность в контроле. Видимо, это связано с адаптацией и переходом клеток гриба из состояния биологического покоя к состоянию физиолого-биохимической активности.

В настоящее время часто в процессах получения биологически активных соединений с успехом используют неспецифические и специфические индукторы биосинтеза. Иногда индукторы синтезируют химическим путём, часто в этих целях используют широко распространённые в природе активные вещества. Известно, например, что представители рода *Trichoderma* синтезируют β -индолилуксусную кислоту, которая, вероятно, в физиологических концентрациях способна оказать существенное влияние на метаболизм грибов. Учитывая эти обстоятельства,

были проведены исследования, в которых к питательной среде добавляли растворы фитогормонов, аминокислот, а также было проанализировано добавление в ферментационную среду стерильной культуральной жидкости *Brevibacterium* sp. — продуцента L-лизина (табл. 7).

Как видно из приведённых результатов, повышение активности L-лизин- α -оксидазы отмечалось при добавлении в ферментационную среду β -индолилуксусной кислоты, L-лизина, смеси аминокислот L-лизина, L-фенилаланина, L-метионина (субстратная специфичность штамма была проявлена именно к этим аминокислотам), но особенно высокая активность фермента наблюдалась при добавлении в ферментационную среду стерильной культуральной жидкости *Brevibacterium* sp. — продуцента L-лизина (почти в три раза).

Можно предположить, что с целью получения максимального биосинтеза фермента L-лизин- α -оксидазы при ферментации в промышленных условиях возможно использования стерильной культуральной жидкости *Brevibacterium* sp. — продуцента L-лизина.

Выводы

1. Не все исследованные штаммы рода *Trichoderma* обладает L-лизин- α -оксидазной активностью. Из 18 исследованных штаммов *Trichoderma* способность к образованию L-лизин- α -оксидазы обладали 5 штаммов.

2. Наибольший биосинтез L-лизин- α -оксидазы штаммом № 2 *Trichoderma* наблюдался при стационарном и поверхностном способе выращивания гриба на среде с пшеничными отрубями.

3. Поиск продуцентов оксидаз L-аминокислот среди штаммов рода *Trichoderma* необходимо проводить как в кислой (pH 5,0), так и щелочной (pH 8,0) pH реакционной среде.

4. Максимальный биосинтез L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma* sp. происходит на восьмые сутки роста культуры на твёрдой питательной среде с пшеничными отрубями, а при

глубинном культивировании на 3—4-е сутки роста.

5. Среда, содержащая в качестве источника углерода глицерин, лактозу и этанол, неблагоприятны для образования фермента.

6. Продуцент L-лизина *Brevibacterium* sp. индуцирует L-лизин- α -оксидазную активность *Trichoderma* spp.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A. et al. New antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma viride*. J Biol Chem 1980; 255: 3: 976—981.
2. Смирнова И. П., Сяткин С. П., Берёзов Т. Т. Спектрофотометрический микрометод определения L-лизин- α -оксидазы. Вopr мед хим 1984; 1: 133—136.
3. Смирнова И. П. Продуценты оксидаз L-аминокислот и возможные области их практического применения. Биотехнология 1991; 3: 3—7.
4. Смирнова И. П., Алексеев С. Б., Подборонов В. М. Изучение влияния гелевой формы L-лизин- α -оксидазы на развитие офтальмогерпеса и герпетических поражений кожи кролика. Антибиотики и химиотер 2003; 48: 11: 11—13.
5. Смирнова И. П., Диджяпетрени Я., Алексеев С. Б. и др. Воздействие L-лизин- α -оксидазы на карциному кожи мышей, индуцированную метилхолантроном. Там же; 2001; 46: 4: 13—15.
6. Селищева А. А., Алексеев С. Б., Смирнова И. П., Подборонов В. М. Эффективность антигерпетического действия различных лекарственных форм L-лизин- α -оксидазы. Там же, 2003; 48: 1: 9—12.
7. Жукова О. С., Хадуев С. Х., Берёзов Т. Т. Влияние L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma* sp. на кинетику цикла культивируемых клеток лимфомы Беркитта. Экспер онкол 1985; 6: 42—44.
9. Хадуев С. Х., Жукова О. С., Добрынин Я. В. и др. Цитостатический эффект L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma* sp. и из *Trichoderma viride*. Бюлл экспер биол мед 1987; 4: 458—460.
10. Хадуев С. Х., Глазкова Т. Ю., Веса В. С. и др. Оценка противолейкозной активности L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma* sp. в химиотерапевтических опытах. Там же; 1980; 10: 476.
11. Уманский В. Ю., Хадуев С. Х., Залеток С. П. и др. Антиметастатический эффект L-лизин- α -оксидазы. Там же; 1990; 5: 458—459.
12. Смирнова И. П., Алексеев С. Б., Подборонов В. М., Гришин В. М. Влияние L-лизин- α -оксидазы, как ингибитора репродукции ВИЧ на специфичность синтеза клеточных белков. Аллергол иммунол 2005; 6: 3: 36—30.
13. Смирнова И. П., Гуськова Т. А., Пушкина Т. В., Подборонов В. М. Антибактериальная и антигрибковая активность L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma*. Сибирь-Восток 2003; 1: 61: 10—12.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J Biol Chem 1951; 193: 265.