

НОВЫЙ ИСТОЧНИК ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТА СУПЕРОКСИДИДИСМУТАЗА

В.А. Колодязная, канд. биол. наук, **Е.П. Яковлева**, док. биол. наук, профессор
Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия;
197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 14

E-mail: vera.kolodyaznaya@pharminnotech.com

Исследовано наличие фермента супероксиддисмутаза среди 40 штаммов дрожжей и дрожжеподобных грибов представителей разных родов.

Выделена активная культура – *S. cerevisiae* шт. №2 – с высоким синтезом супероксиддисмутаза при одновременном накоплении значительного количества биомассы. Подобраны оптимальные соотношения углеводных и минеральных компонентов в составе питательной среды и технологические параметры выращивания.

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, дрожжи, продуцент, углеводное и минеральное питание, технологические условия культивирования.

Все процессы микробиологического синтеза требуют интенсивного перемешивания и аэрации, при которых осуществляется постоянный контакт микроорганизмов с воздухом, т.е. с кислородом. Молекулярный кислород имеет двойное влияние на живой организм. С одной стороны, он необходим клетке при аэробном дыхании, с другой, он токсичен, так как в нормальных условиях восстанавливается с образованием супероксидного радикала и других активных форм кислорода. Они являются токсинами, действие которых обусловлено окислением сульфгидрильных групп в ферментах, что приводит к ингибированию их активности, окислению липидов с разрушением мембранных структур клетки и структуры ДНК [1, 2].

В организме человека также происходит образование отрицательно заряженного радикала кислорода (супероксида, O_2^-), инициирующего процессы свободнорадикального окисления в клетке. Увеличение количества супероксидных радикалов кислорода зарегистрировано при различных патологических процессах в организме человека, в том числе при раковых заболеваниях, атеросклерозе, инфаркте миокарда, ревматоидном артрите и др. [3].

В качестве источника получения фермента может быть использовано животное сырье (эритроциты крови и печень животных). Вместе с тем супероксиддисмутаза (СОД) обнаружена практически у всех прокариотных и эукариотных микроорганизмов [5]. Среди микроорганизмов особый интерес представ-

ляют дрожжи и дрожжеподобные грибы, образующие СОД, близкую по своему строению и свойствам к СОД человека. Кроме того, дрожжевые организмы растут на простых по составу питательных средах и имеют короткий цикл роста, что имеет положительное значение при разработке технологии данного фермента.

Цель исследования – изучить содержание СОД у дрожжей и дрожжеподобных грибов и выявить условия выращивания отобранных продуцентов, обеспечивающих максимальный синтез фермента.

Экспериментальная часть

В работе использовали 40 штаммов дрожжей и дрожжеподобных грибов разных родов из Всероссийской коллекции микроорганизмов и коллекции Санкт-Петербургской клинично-фармацевтической академии.

Культуры выращивали в колбах, содержащих 100 мл питательной среды, на качалке (220 мин^{-1}) при температуре $26 \pm 2,0^\circ\text{C}$. Количество биомассы и ее влажность определяли с помощью термогравиметрического инфракрасного влагомера МА-15. Динамику накопления биомассы микроорганизмами оценивали по изменению оптической плотности клеток при одинаковой степени разведения культуральной жидкости на спектрофотометре «Hitachi U-5100» при длине волны 420 нм. Для определения активности СОД предварительно получали дрожжевую пасту, из которой затем готовили бесклеточный экстракт, разрушая клетки 4-кратным «замораживанием–оттаиванием» при температуре $-18 \pm 2^\circ\text{C}$. К размороженной дрожжевой пасте добавляли 0,05 М фосфатный и экстрагировали при непрерывном перемешивании. Полученную взвесь центрифугировали на рефрижераторной центрифуге. Экстракт отфильтровывали и использовали для измерения активности СОД, которую определяли по методу Фридовича в системе тетразолий синий – метионин хлорид ($\text{NBT} \cdot 2\text{HCl}$) – рибофлавин, оценивая интенсивность окрашивания спектрофотометрически при длине волны 500 нм. За единицу активности принимали такое количество фермен-

та, которое ингибировало на 50% восстановление NBT • 2HCl и рассчитывали на 1 мг белка, определенного по методу Лоури [4].

Интенсивность аэрации при выращивании дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* шт. № 2 изучали на инкубационном шейкере Certomat @ CT plus путем варьирования объема питательной среды в колбах от 25 до 100 мл.

Поскольку максимальный уровень активности СОД приходится на конец экспотенциальной фазы роста микроорганизма и перехода ее в начало стационарной фазы [6, 7], для каждого исследуемого штамма дрожжей и дрожжеподобных грибов в условиях глубинного выращивания контролировали динамику накопления биомассы для определения момента перехода культуры из экспотенциальной фазы роста в стационарную (табл. 1).

Так как СОД – внутриклеточный фермент, особое внимание обращали на те культуры, которые образовывали большое количество биомассы с высоким содержанием в ней фермента за более короткий промежуток времени. Из исследованных микроорганизмов этим требованиям в большей степени соответствовали все 5 штаммов дрожжей *Saccharomyces*. В последующем из 5 штаммов дрожжей был отобран продуцент СОД – культура *S. cerevisiae* шт. № 2 – со следующими характеристиками: продолжительность культивирования – 18 ч, количество биомассы по сухому весу – $4,5 \pm 0,2$ г/л, содержание СОД – от $2,0 \pm 0,3$ ЕД/мг белка.

Отбор активного продуцента СОД на богатой глюкозо-пептонной среде, которая содержит органические вещества (пептон и кукурузный экстракт), в дальнейшем будет затруднять процесс выделения среды и очистки фермента от сопутствующих примесей. Поэтому выращивание дрожжей *S. cerevisiae* шт. № 2 проводили на синтетической среде Ридера, в которой глюкоза заменена в равной концентрации на другие источники углерода (сахароза, глице-

рин, меласса) на фоне постоянного минерального состава (табл. 2). Сахароза оказалась наиболее благоприятным источником углерода для синтеза СОД. При замене глюкозы на сахарозу в составе питательной среды образование фермента возрастало почти в 3 раза до $6,4 \pm 0,84$ ЕД/мг белка при увеличении количества биомассы на 25%. Аналогичные данные получены и при введении в состав среды мелассы. Меласса является отходом свеклосахарного производства и широко используется при получении хлебопекарных дрожжей. Она содержит 46–50% саха-

Таблица 1

СОДЕРЖАНИЕ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И БИОМАССЫ У РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ И ДРОЖЖЕПОДОБНЫХ ГРИБОВ

Микроорганизм	Конец экспотенциальной фазы роста микроорганизмов		
	продолжительность культивирования, ч	количество сухой биомассы, г/л	активность СОД, ЕД/мг белка
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> шт. № 46	19	4,1	1,4
2. <i>S. cerevisiae</i> шт. ВКМ-379	23	4,5	1,6
3. <i>S. cerevisiae</i> шт. S-280	20	3,9	1,7
4. <i>S. cerevisiae</i> шт. № 2	18	4,6	2,0
5. <i>S. cerevisiae</i> шт. 437-К	24	4,2	1,8
6. <i>S. carlsbergensis</i> ВКМ-336	22	3,0	0,4
7–9. <i>S. ludwigei</i> шт. 38, шт.45, шт.48	25,28,19	3,1–3,8–4,1	0,2–0,8–0,6
10. <i>Candida quillermondii</i> шт. 1-3	27	4,8	0,6
11–12. <i>C. krusei</i> шт.70, шт. 128	31–35	4,8–5,0	0,2–0,5
13–14. <i>C. parapsilosis</i> шт. 88, шт. 90	33–37	6,2	0,6
15. <i>C. parakrusei</i> шт. 2010	28	4,4	1,3
16–18. <i>C. tropicalis</i> шт. 5, шт. 72,шт. 97	25–28–35	4,0–3,8–5,0	0,9–0,7–0,5
19–20. <i>C. utilis</i> шт. ВКМ-74, ВКМ-77	17–18	2,3–2,9	0,5–0,7
21. <i>Rhodotorula aurantiaca</i> шт. ВКМ-327	28	6,6	0,4
22. <i>Rh. lactosa</i> шт. IFO 1005	27	6,4	0,6
23. <i>Rh. macilagosam</i> шт. ВКМ-339	28	5,6	0,3
24–25. <i>Rh. glutinosus</i> шт. ВКМ-332, ВКМ-334	24–25	5,2–5,8	0,5–0,6
26. <i>Torulopsis candida</i> шт. U-151	38	0,5	0,7
27. <i>T. aeria</i> шт. O 11-7	25	6,2	0,3
28. <i>Hansenula kluyveri</i> шт. U-99	42	0,8	1,4
29–31. <i>H. anomala</i> шт. 60, шт. 288, шт. 290	18–21–19	0,5–0,7–0,5	1,9–2,0–1,9
32. <i>Debariomyces hansenii</i> шт. 116	49	0,3	1,2
33–35. <i>D. species</i> шт. СВ-53, СВ-58, СВ-60	50–58–46	0,5–0,7–0,9	1,8–2,0–1,8
36. <i>Sporobolomyces odorosus</i> шт.	38	0,7	1,1
37–38. <i>S. roseus</i> шт. U-49, U-69	43–38	2,3–2,9	0,9
39–40. <i>Lypomyces lipoferus</i> шт. 1752, шт. 1740	22–28	0,5–0,9	0,8

Примечание. Через интервал указаны значения для нескольких штаммов (шт.) указанного вида дрожжей.

розы, азотистые и минеральные вещества, поэтому также может использоваться при выращивании продукта СОД – *S.cerevisiae* шт. № 2.

По мнению ряда исследователей, дрожжи *S.cerevisiae* образуют Cu/Zn супероксиддисмутазу, по своим свойствам близкую к СОД, выделенной из животных тканей и эритроцитов крови человека [8]. В связи с этим возможна регуляция синтеза этого фермента включением минеральных солей, содержащих ионы ряда металлов, в состав синтетической среды Ридера. Добавление минеральных солей в ферментационную среду сопровождалось значительным возрастанием уровня накопления фермента без существенного влияния на образование биомассы. Среди них наибольший положительный эффект по сравнению с другими минеральными солями был достигнут при добавлении в среду меди сернокислой. В этом случае содержание фермента в дрожжевой биомассе повышалось до $12,3 \pm 2,7$ ЕД/мг белка.

Температура и аэрация – основные физико-химические факторы среды, изменяя их значение можно регулировать образование различных метаболитов у микроорганизмов. Поэтому эти параметры необходимо учитывать при разработке технологии любых биологически активных веществ. Данные о влиянии температуры на рост дрожжей и синтез СОД свидетельствуют о том, что при всех 3 значениях температуры (22, 28 и 35°C) культура *S.cerevisiae* шт. № 2 накапливала достаточное количество биомассы и СОД, но оптимальной является температура 28°C. При температуре 22°C увеличи-

валась фаза роста дрожжей и максимальное накопление биомассы приходилось на 27 ч культивирования, а при температуре 35°C культура, наоборот, быстро росла (12 ч), но содержание в ней фермента снижалось до $7,7 \pm 0,7$ ЕД/мг белка.

Микроорганизмы отличаются широким диапазоном разнообразия в отношении толерантности к кислороду. Многие исследователи отмечают увеличение синтеза СОД при высоких концентрациях кислорода [5, 7]. Проведены исследования по регулированию интенсивности аэрации при развитии дрожжей *S.cerevisiae* шт. № 2 в условиях глубоководной ферментации, поскольку этот параметр имеет и важное технологическое значение. Из полученных данных (табл. 3) следует, что максимальное накопление биомассы и СОД происходит при интенсивной аэрации среды и концентрации растворенного кислорода, равной $1,82 \text{ г } O_2/\text{л} \cdot \text{ч}$. При таком уровне аэрации количество биомассы увеличивалось незначительно, но содержание в нем фермента возрастало почти на 50% и достигало $19,4 \pm 2,3$ ЕД/мг белка, что соответствует данным литературы [5, 7]. Полученные данные по выбору активного продуцента СОД могут быть положены в основу разработки технологии (стадия ферментации) получения этого фермента.

Выводы

1. Отобран активный продуцент супероксиддисмутазы среди дрожжей и других грибов – *Saccharomuces cerevisiae* шт. №2.
2. Установлены условия его культивирования, позволяющие увеличить накопление биомассы дрожжей и синтез фермента до $19,4 \pm 2,3$ ЕД/мг белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Купчинская С.С. Биологическая и патогенетическая роль антиоксидантной системы в функционировании живого организма. Тольяттинский медицинский консилиум, 2014; 1–2: 56–59.
2. Плакунов В.К., Шелемех О.В. Механизм кислородной регуляции у микроорганизмов. Микробиология, 2009; 78 (5): 592–604.
3. Бондаренко Т.И., Кутилин Д.С., Майборода Е.А., Михалева И.И. Пептидные биорегуляторы в профилактике преждевременного старения. Международный научно-исследовательский журнал, 2014; 2–1 (21): 52–53.
4. Биссвангер Х. Практическая энзимология (пер. с англ.) М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011; 328.
5. Вольхина В.Е., Шафрановская Е.В. Супероксиддисмутазы: структура и свойства. Вест. Витебского государственного медицинского университета, 2009; 8 (4): 6–12.
6. Павлова Е.С., Кудряшов В.П., Маликова Н.В. Выделение фермента супероксиддисмутазы (СОД) из дрожжей. Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК. (под ред. В.А. Полякова, Л.В. Римаревой) М.: 2006; 88–97.
7. Kvasko O.Yu., Matvieieva N.A. Increasing of antioxidant and superoxide dismutase activity in chicory transgenic plants. Biopolymers and cel., 2013; 29 (2): 163–166.
8. Чжань Ц.Ю., Чжоу Ц.Г., Шань В.Г. Получение и изучение свойств Cu-, Zn-зависимой супероксиддисмутазы, ковалентно модифицированной полинасыщенными жирными кислотами. Биохимия, 2009; 74 (11): 1555–1559.

Поступила 3 апреля 2015 г.

Таблица 2
ФЕРМЕНТАЦИЯ S. CEREVISIAE ШТ. № 2 НА СРЕДЕ РИДЕРА С РАЗЛИЧНЫМИ ИСТОЧНИКАМИ УГЛЕРОДА И МИНЕРАЛЬНЫХ СОЛЕЙ

Источники углерода	Количество влажной биомассы, г/л	Активность СОД, ЕД/мг белка
Глюкоза	$16,3 \pm 0,8$	$2,2 \pm 0,3$
Сахароза	$21,4 \pm 1,2$	$6,4 \pm 0,8$
Глицерин	$15,2 \pm 0,9$	$4,8 \pm 0,6$
Меласса	$20,8 \pm 0,8$	$6,3 \pm 0,7$

Таблица 3
ВЛИЯНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ АЭРАЦИИ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ ДРОЖЖЕЙ S. CEREVISIAE НА НАКОПЛЕНИЕ БИОМАССЫ И СИНТЕЗ СОД

Объем среды, мл	Концентрация растворенного кислорода, г $O_2/\text{л} \cdot \text{ч}$	Количество влажной биомассы, г/л	Активность СОД, ЕД/мг белка
25	1,92	$26,5 \pm 1,5$	$19,4 \pm 2,3$
50	1,36	$25,8 \pm 1,8$	$17,2 \pm 1,9$
100	0,86	$23,9 \pm 1,4$	$14,7 \pm 2,1$

A NEW SOURCE TO OBTAIN THE ENZYME SUPEROXIDE DISMUTASE

V.A. Kolodyaznaya, PhD; Professor E.P. Yakovleva, PhD

Saint Petersburg Chemopharmaceutical Academy; 14, Prof. Popov St., Saint Petersburg 197376

SUMMARY

Yeasts and yeastlike fungi produce superoxide dismutase similar to the structure and properties of a respective human enzyme. The presence of this enzyme among 40 strains of the representatives of the genera *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Debaromyces* and *Lipomyces* was investigated. The investigators isolated the active culture *Saccharomyces cerevisiae* No. 2 with the high synthesis of the enzyme and simultaneous accumulation of a great deal of biomass. The optimal ratios of carbohydrate to mineral components as part of a nutrient medium and the technological parameters (temperature, aeration) of yeast growth, which increased the accumulation of the enzyme in the yeast cells up to 19.4 IU/mg of protein, were chosen. The selected strain may be used to develop superoxide dismutase manufacturing technology.

Key words: superoxide dismutase, yeast, producer, culture conditions.

REFERENCE

1. Kupchinskaya S.S. Biological and pathogenetic role of the antioxidant system in the functioning of a living organism (review of the sources). S.S. Kupchinskaya - Togliatti medical consultation. 2014; 1-2: 56-59 (in Russian).
2. Plakun V.K., Shelemeh O.V. The mechanism of the oxygen regulation of microorganisms. *Microbiology*; 2009; Vol. 78; 5: 592-604 (in Russian).
3. Bondarenko T.I., Kutilin D.S., Mailboroda E.A., Mikhaleva I.I. Peptide bioregulators in the prevention of a premature aging. *International Research Journal*, 2014; 2-1 (21): 52-53 (in Russian).
4. Bisswanger H. *Practical Enzymology*. H.Bisswanger, trans. from Eng. M.: BINOM, Laboratory of knowledge, 2011: 328 (in Russian).
5. Volykhina V.E., Shaphranovskaya E.V. Superoxide dismutase: structure and properties. *Bulletin of the Vitebsk State Medical University*. 2009; Vol. 8; 4: 6-12 (in Russian).
6. Pavlova E.S., Kudryashov V.P., Malikova N.V. Isolation of the enzyme superoxide dismutase (SOD) from yeast. *Coll. Microbial biocatalysts for processing agricultural industries*. Edited by V.A. Polyakov, L.V. Rimoreva. M; 2006: 88-97 (in Russian).
7. Kvasko O.Yu., Matvieieva N.A. Increasing of antioxidant and superoxide dismutase activity in chicory transgenic plant. *Biopolymers and cel.* 2013; Vol. 29; 2: 163-166.
8. Chzhan Ts.Yu., Chzhou Ts.G., Shan V.G. Production and study of properties of Cu, Zn- dependent superoxide dismutase, covalently modified by polysaturated fatty acids. *Biochemistry*. 2009; Vol. 74, 11: 1555-1559 (in Russian).