

Макрушин Кирилл Валерьевич

L-лизин- α -оксидазы гриба
Trichoderma cf. aureoviride Rifai ВКМ F-4268D

03.02.03 – Микробиология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Оболенск 2019

Работа выполнена в лаборатории адаптации микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (ИБФМ РАН)

Научный руководитель:

Аринбасарова Анна Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Федеральный исследовательский центр «Пушкинский Научный центр биологических исследований РАН»

Официальные оппоненты:

Садыкова Вера Сергеевна, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Мысякина Ирина Сергеевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «__» _____ 2019 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 на базе Федерального государственного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, Серпуховский район, пос. Оболенск

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Автореферат разослан «____» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Оксидазы L-аминокислот привлекают все большее внимание исследователей благодаря разнообразию их биологической активности. В частности, выявлены бактериостатические, противопрозоидные, противогрибковые, противовирусные, антипролиферативные, противоопухолевые свойства этих ферментов, а также влияние на агрегацию тромбоцитов (Березов, 2005; Лукашева и др., 2012; Pollegioni *et al.*, 2013; Pokrovsky *et al.*, 2017).

Оксидазы L-аминокислот – флаavin-содержащие ферменты, относящиеся к классу оксидоредуктаз. Эти ферменты широко распространены в природе и обнаружены у животных (Murthy *et al.*, 1999; Kitani *et al.*, 2007) и микроорганизмов, включая грибы (Sikora *et al.*, 1982; Nidermann and Lerch, 1991; Weber *et al.*, 1994; Calderon *et al.*, 1997; Папоян и др., 2001) и бактерии (Lucas-Elio *et al.*, 2006).

В зависимости от микроорганизма-продуцента оксидазы L-аминокислот различаются по своим биохимическим свойствам: молекулярной массе, каталитической активности, субстратной специфичности, биологической активности и локализации в клетке (Pollegioni *et al.*, 2013).

L-лизин- α -оксидаза (ЛО) (E.C.1.4.3.14) – один из ферментов, перспективных в энзимотерапии опухолей, основанной на разной чувствительности нормальных и опухолевых клеток к дефициту факторов роста, в том числе, аминокислот (Березов, 2005).

ЛО катализирует окислительное дезаминирование L-лизина с образованием аммиака, пероксида водорода и α -кето- ϵ -аминокапроновой кислоты (Лукашева и др., 2002).

Впервые ЛО получили японские исследователи из гриба *Trichoderma viride* и показали противоопухолевое действие на культуре раковых клеток в 1979 г. (Kusakabe *et al.*, 1979, 1980). С тех пор они являются монополистами по производству фермента в мире.

В последние годы разрабатываются новые противоопухолевые препараты на основе ферментов, и продемонстрированы существенные достижения в области доклинических и клинических испытаний. Но до настоящего времени в онкологии применяется единственный противоопухолевый фермент L-аспарагиназа, эффективный при лечении лейкоза (Pokrovsky *et al.*, 2014, 2017).

В опытах *in vivo* показано, что ЛО также эффективна при лечении лейкоза, кроме того, она активна в отношении и других опухолей (Pokrovsky *et al.*, 2013). Лекарственный препарат на основе ЛО не заменит L-аспарагиназу, но позволит расширить диапазон терапевтического использования противоопухолевых ферментов.

До настоящего времени в России создание лекарственной формы ЛО сдерживалось отсутствием активного штамма-продуцента, а также отсутствием эффективной технологии получения фермента. Разработанные ранее методы выделения и очистки ЛО были неэффективными, трудоемкими или не отвечали экологическим нормам производства из-за использования больших объемов органических растворителей (Смирнова и др. 1984; Пат. РФ 2002108326 (13) А, 2004, Weber *et al.*, 1994).

Среди продуцентов ЛО особое внимание привлекают грибы рода *Trichoderma*, которые являются единственными известными в настоящее время продуцентами внеклеточных оксидаз L-аминокислот, в том числе ЛО (Лукашева и др., 2012). Факт внеклеточного накопления фермента предполагает создание более технологичной и экономичной схемы его выделения.

Известно, что грибы *Trichoderma* синтезируют множество метаболитов (литические ферменты, антимикробные агенты различного химического строения), что обеспечивает им высокий адаптационный потенциал (Harman, 2006; Vinale *et al.*, 2008; Navarova *et al.*, 2012; Bernsdorff *et al.*, 2016). Именно способность к синтезу таких соединений играют важную роль в

формировании микробиоценозов почвы и лежит в основе использования этих грибов в качестве экологически безопасных биопестицидов в борьбе с инфекционными болезнями растений.

На фоне детального исследования этих метаболитов, контролирующей численность фитопатогенов, факт синтеза внеклеточной ЛО грибами *Trichoderma* остается за рамками изучения ее физиологической роли в природном окружении, в том числе как возможного фактора биоконтроля.

Степень разработанности темы исследования

Изучением биосинтеза и свойств ЛО занимались многие ученые (Kusakabe *et al.*, 1980; Weber *et al.*, 1994; Лукашева и др., 2002; Смирнова и др., 2015; Chen *et al.*, 2012; Amano *et al.*, 2017; Pokrovsky *et al.*, 2017). Интерес к ЛО обусловлен перспективой ее использования в энзимотерапии опухолей, основанной на использовании ферментов в качестве одного из самых тонких и избирательных инструментов для направленного изменения метаболизма раковых клеток (Березов 2005; Лукашева и др., 2012; Pollegioni *et al.*, 2013; Pokrovsky *et al.*, 2017).

К ферментным препаратам предъявляется ряд определенных требований: кроме биологической активности и низкой токсичности обязательны узкая субстратная специфичность, высокая активность, стабильность, отсутствие необходимости добавления эндогенных кофакторов (в том числе, коферментов) и медленный вывод из организма. Сочетание этих требований, а также доступность получения из непатогенных микроорганизмов ограничивает перспективу использования многих противоопухолевых средств. Сравнение с известными характеристиками других противоопухолевых ферментов позволит дать реальный прогноз применения ЛО в онкологической практике.

Впервые фермент ЛО был выделен из экстракта гриба *T. viride* японскими учеными в лаборатории профессора Soda (Kusakabe *et al.*, 1980). Этими же авторами было показано торможение роста ферментом культуры лейкозных клеток (Kusakabe *et al.*, 1979).

Многие исследователи (Weber *et al.*, 1994; Лукашева и др., 2002; Смирнова и др., 2009; Шнайдер 2012) также используют грибы *Trichoderma* в качестве продуцента ЛО. Сравнительно невысокие эффективности процессов, как биосинтеза, так и выделения ЛО не позволяли получать качественный препарат фермента ЛО в количествах, необходимых для клинических испытаний и последующего практического использования в терапии опухолей. Удовлетворительная активность препаратов ЛО достигалась только в виде композиций в присутствии усилителей биологической активности (антиоксиданты, витаминный препарат, иммуномодуляторы и др.) (Пат. РФ 2002108326 (13) А, 2004).

Создание эффективной конкурентоспособной схемы получения ЛО с использованием нового активного штамма-продуцента является ключевым этапом создания лекарственного препарата ЛО.

Грибы *Trichoderma* привлекают внимание исследователей также в связи с изучением системной устойчивости растений (Návarová *et al.*, 2012; Vogel-Adghough *et al.*, 2013; Bernsdorff *et al.*, 2016). Обработка растений препаратами *Trichoderma* сопровождается развитием у них устойчивости к фитопатогенам и различным стрессовым факторам.

Было показано антимикробное действие культуральной жидкости грибов *Trichoderma* (Попова и Садыкова, 2014; Смирнова и др., 2017). Внесение в почву биопрепаратов на основе грибов *Trichoderma* снижает содержание патогенной микрофлоры в ризосфере растений и приводит к ее оздоровлению (Алимова и др., 2006, 2007; Садыкова и др., 2015). Показано также, что контроль численности патогенов грибами *Trichoderma* обусловлен их способностью синтезировать антибиотические соединения и комплексы литических ферментов (Harman, 2006; Bernsdorff *et al.*, 2016).

В настоящее время не изучен механизм антимикробного действия ЛО. Установлен механизм действия других оксидаз аминокислот (фенилаланин-оксидазы) из грибов *Trichoderma* (Chen *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011, 2012; Hanane-Fadila and Fatima, 2014).

Ничего не известно также об участии ЛО из грибов *Trichoderma* в индуцировании системной устойчивости растений.

Цель работы - получить гомогенный препарат ЛО для медицинских исследований, а также показать возможную функциональную роль внеклеточной ЛО для продуцента.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. выделить активный штамм-продуцент ЛО среди представителей грибов рода *Trichoderma*;
2. определить оптимальные условия культивирования продуцента и синтеза ЛО (тип культивирования, субстрат роста, pH, температура, pO_2);
3. разработать эффективный метод очистки ЛО;
4. изучить основные ферментативные свойства ЛО, значимые для использования в медицине: кинетические характеристики, устойчивость к действию температуры, pH, протеолитических ферментов, детергентов, стабильность при хранении и др.;
5. определить внеклеточные метаболиты гриба, предопределяющие функции ЛО для продуцента в природной окружающей среде;
6. изучить антимикробное действие ЛО.

Научная новизна

Среди 14 штаммов *Trichoderma* из ВКМ (ИБФМ РАН) и 8 штаммов изолятов из образцов лесных почв был найден новый высокоактивный природный штамм-продуцент ЛО. Выделенный штамм был идентифицирован и депонирован в ВКМ (ИБФМ РАН) как *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D.

Впервые показан синтез ЛО в условиях роста *Trichoderma* на средах, содержащих семена культурных и диких злаковых растений.

Впервые подобраны условия культивирования гриба, позволяющие получить высокий уровень биосинтеза ЛО. Накопление фермента в ростовой среде достигало (175 Е/г субстрат). В настоящее время данные о получении такого высокого уровня биосинтеза ЛО при любых типах ферментации *Trichoderma* в научной литературе отсутствуют.

Предложены два метода очистки фермента: один из них базируется на общепринятых (рутинных) подходах; второй – оригинальный метод, основанный на осаждении ЛО из культуральной жидкости солями Cu^{2+} . Оба метода позволяют получить гомогенный препарат ЛО с высокой активностью (100 Е/мг белка) и практическим выходом 60%.

Впервые исследованы кинетические характеристики фермента с учетом аллостерических эффектов. Были оценены коэффициент Хилла ($h = 2,03 \pm 0,14$) и константа Михаэлиса-Ментен ($K_m = 1,015 \cdot 10^{-5} M$), величина которой показывает высокое сродство ЛО к лизину.

Впервые выявлены факторы, предопределяющие возможную функциональную роль ЛО как участие во взаимоотношениях «Растение – *Trichoderma* – Фитопатоген». Показано, что биосинтез фермента сопровождается накоплением в среде роста пипеколиновой кислоты и пероксида водорода – элиситоров системной устойчивости растений.

Впервые изучены механизмы антимикробного действия ЛО как фактора конкуренции гриба *Trichoderma* с грамотрицательными и грамположительными бактериями, а также фитопатогенными грибами.

Научно-практическое значение

С использованием найденного нами активного штамма-продуцента разработан лабораторный регламент получения ЛО. Полученный гомогенный препарат ЛО проходит

доклиническое исследование в ГОУ «Российский онкологический научный центр» им. Н.Н. Блохина.

Установленные свойства гомогенного препарата ЛО, такие как высокая активность и стабильность, а также узкая субстратная специфичность и высокое сродство к лизину позволяют его использование в медицинских исследованиях как перспективное лекарственное средство в терапии онкологических заболеваний.

Кроме того, указанные свойства предполагают использование ЛО в биоинженерии белков, а также для создания биохимических тестов для определения лизина.

Активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий позволит использовать ЛО в качестве перспективного потенциального инструмента в разработке новых лекарственных средств против бактерий, резистентных к антибиотикам.

Результаты исследования дополняют представления о взаимоотношениях «Растение – *Trichoderma* – Патоген», развитии системной устойчивости растений, а также об использовании грибов рода *Trichoderma* в качестве биоконтрольного агента и их адаптационном потенциале.

Полученные результаты могут быть использованы для разработки новых эффективных препаратов на основе грибов *Trichoderma* - активных продуцентов ЛО - для защиты растений от фитопатогенов и обеспечения высокой урожайности и хранения полученных сельскохозяйственных продуктов.

Личный вклад автора

Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

Положения, выносимые на защиту:

- Штамм-продуцент ЛО *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D, отобранный в результате скрининга, используется для проведения эффективных процессов биосинтеза ЛО в биореакторах лабораторного типа. Оптимизированы условия биосинтеза ЛО, что обеспечивает высокий уровень накопления ЛО в культуральной жидкости (175 Е/г субстрата, 12,5 Е/мл).

- Создана эффективная схема получения гомогенного препарата ЛО с высокой удельной активностью (100 Е/мг белка) с выходом 60%. Оформлен лабораторный регламент получения фермента.

- Показано антимикробное действие ЛО против грамотрицательных (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ГИСК 453) и грамположительных (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus durans* ВКМ В-603, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Clostridium sporogenes* ГИСК 272) бактерий, а также микроскопических грибов (*Aspergillus niger* ВКМ F-1119, *Fusarium decemcellulare* ВКМ F-1179 и *Rhizoctonia solani* ВКМ F-895). Механизм антимикробного действия основан на образовании экзогенного H_2O_2 (в результате каталитической реакции), а также генерации внутриклеточных АФК.

- ЛО из *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D характеризуется высокой активностью, низкой энергией активации, высокой селективностью и стереоспецифичностью, высоким сродством к L-лизину, стабильностью. Указанные свойства играют значимую роль в антагонистическом действии против бактерий и фитопатогенных грибов.

- Процесс синтеза ЛО грибом *Trichoderma* сопровождается накоплением в ростовой среде пипеколиновой кислоты и H_2O_2 - элиситоров системной устойчивости растений. Этот факт, а также антимикробное действие ЛО позволяют предположить функциональную роль этого фермента для *Trichoderma* в природном окружении как участие во взаимоотношениях «Растение – *Trichoderma* – Патоген».

Степень достоверности и апробация работы

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении науки института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук.

Часть работы выполнена в рамках гос. Контракта № 9-1-ЦФ-08 а также научно-технической программы «Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний» на 2007-2012 гг.

Основные положения, заключение и практические предложения, сформулированные в диссертации, отвечают целям и задачам работы. Экспериментальные исследования выполнены на сертифицированном современном оборудовании. Обоснованность и достоверность результатов исследований подтверждена статистической обработкой полученных данных.

Основные положения работы были представлены в рамках проекта "УМНИК" (Пушино, 2008-2010), Российской школе-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Москва-Пушино, 2008), международной школе-конференции «Биология-наука 21 века» (Пушино, 2010), международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2009, 2011, 2017), IV съезде микологов России (Москва, 2017).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из них 6 статей в рекомендованных ВАК РФ рецензируемых научных журналах, входящих в международные базы данных.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, экспериментальной части, заключения, выводов, списка литературы, включающего 235 ссылку и приложения. Текст работы занимает 130 страницы, содержит 36 рисунка и 18 таблиц.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю к.б.н. Аринбасаровой А.Ю. и научному консультанту д.б.н. Меденцеву А.Г. за практическую помощь, ценные советы и поддержку в написании диссертации. Автор искренне признателен д.ф.-м.н. Кутышенко В.П. (лаборатория ЯМР-исследований биосистем, ИТЭБ РАН, г. Пушино) за помощь в установлении структуры белковой молекулы ЛО, д.б.н., проф. Лукашевой Е.В. (кафедра биохимии им. академика Березова Т.Т., РУДН) за исследование противоопухолевой активности ЛО, к.б.н. Чигиной Н.И. (Всероссийская коллекция микроорганизмов) за помощь в идентификации штамма продуцента, Баскунову Б.П. (ИБФМ РАН) за помощь в проведении масс-спектрометрических исследований, Лысанской В.Я. (ВКМ ИБФМ РАН) за проведение анализа аминокислот, д.х.н. Крупянко В.И. за помощь в изучении кинетических параметров ЛО, к.б.н. Ашина В.В. за помощь в проведении исследований и всех коллег лаборатории адаптации микроорганизмов принимавших участие в представленной работе на различных этапах ее выполнения.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методология диссертационной работы заключается в комплексном подходе к изучению свойств ферментов и особенностей их синтеза микроорганизмами с использованием современных методов исследования (микробиологические, биохимические, биотехнологические и статистические).

Микроорганизмы. В процессе поиска активного продуцента использовали 14 штаммов *Trichoderma*, полученных из ВКМ (ИБФМ РАН): *T. harzianum* Rifai ВКМ F-1959, *T. longibrachiatum* Rifai ВКМ F-2025, *T. virens* Arx ВКМ F-1117, *T. aureoviride* Rifai ВКМ F-2026, F-2027, *T. viride* Pers. ВКМ F-2721, F-1130, F-1132, F-1133, F-1134, F-1135, F-2430, F-2587, *T.*

koningii ВКМ F-2429. Кроме того, были протестированы 8 штаммов - изолятов, выделенных из образцов почв поля и лесного массива г. Пущино, Московской области.

Отбор штаммов-продуцентов ЛО проводили на плотных средах: Чапека, мальт-агаре, сусло-агаре, а также среде, содержащей пшеничные отруби (10%) и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5%) при 28 °С. Выявление штаммов продуцентов осуществляли с помощью орто-дианизидинового теста на наличие пероксида водорода.

Отобранные штаммы, также тестировали в условиях погруженного культивирования. Грибы выращивали на среде Чапека, содержащей в качестве источника углерода (%): глюкозу – 5,0 или пшеничный крахмал – 5,0, или сахарозу – 5,0 или глюкозу – 1,0 и кукурузный экстракт – 2,0. Для выращивания грибов использовали также среду на основе пшеничных отрубей и различных злаковых культур (3,0-10,0 г на 100 мл дистиллированной воды).

Для стимуляции синтеза ЛО в ростовую среду добавляли следующие соли: NH_4NO_3 , KNO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ в концентрациях 2-8 %. Культивирование осуществляли в колбах объемом 0,75 л, содержащих 100 мл среды роста, в течение 1 - 15 сут на качалке 220 об/мин при 24, 29 или 37 °С.

Таксономическая принадлежность штамма была определена в ВКМ ИБФМ РАН к.б.н. Чигинева Н.И., как описано ранее (Lieckfeldt *et al.*, 2001; Александрова, 2003).

Определение активности ЛО проводили по скорости образования пероксида водорода в 20 мМ трис-фосфатном буфере (рН 8.0) в присутствии о-дианизида (0,2 мМ), пероксидазы (5 мкг/мл) и L-лизина (2 мМ) на спектрофотометре «Shimadzu» ($E_{436}=8,3 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего окисление 1 мкмоль лизина в мин (Березов и др., 1987). Активность ЛО также определяли по потреблению кислорода с помощью закрытого тefлоновой пленкой платинового электрода Кларка при температуре 22 °С.

Выделение ЛО. Культуральную жидкость (КЖ) отделяли от отрубей и биомассы путем фильтрования через ткань и центрифугирования при 6000 г в течение 20 мин. Осадок удаляли, а из супернатанта выделяли целевой продукт, используя осаждение или с помощью сульфата аммония или Cu^{2+} -комплекса, с последующей гидрофобной хроматографией на октил-сефарозе и ионообменной хроматографии на DEAE- Toyopearl HW-55.

Очистка ЛО с помощью осаждения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Стадия 1. После центрифугирования КЖ из супернатанта осаждали ЛО с помощью $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в интервале 25-60 % от насыщения.

Стадия 2. Очистка на октил-сефарозе. Элюцию проводили ступенчато, изменяя концентрацию $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ от 25 % до 5 % в трис-НСl буфере (25 мМ, рН 8,0). Основная часть ЛО элюировалась с колонки при концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, равной 10 %, примесные белки - при 20 и 15 %.

Стадия 3. Дальнейшую очистку ЛО проводили с помощью ионообменной хроматографии на DEAE- Toyopearl HW-55. ЛО обнаруживалась во фракции, элюируемой 0,2 М NaCl.

Концентрацию белка определяли методом Лоури или Бредфорд (Lowry *et al.*, 1951; Bradford, 1976).

Определение молекулярной массы (м. м.) и гомогенности ЛО проводили с помощью электрофореза в денатурирующих условиях (Laemmli, 1970), а также нативного электрофореза в градиенте ПААГ. В качестве маркеров использовали стандарты с м.м. в диапазоне 14,4 – 140 кДа (Sigma, США).

М. м. ЛО определяли также с помощью гель-фильтрации на колонке (1,5 × 95 см) с DEAE- Toyopearl HW-55. Элюцию проводили 0,025 М трис-НСl буфером (рН 7,8). В качестве маркеров использовали стандарты с м. м. от 25 до 140 кДа (Sigma, США).

Спектральный анализ фермента проводили на спектрофотометре «Shimadzu 160». Спектры снимали в присутствии и отсутствии лизина при $\lambda=240-540$ ($l = 1\text{ см}$).

Для количественного определения ФАД фермент (2,5 мг/мл воды) выдерживали на кипящей водяной бане в течение 5 мин, после чего денатурированный белок удаляли центрифугированием (10000 г) и определяли поглощение супернатанта ($E_{460} = 11,3 \times \text{мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

Для определения зависимости активности ЛО от рН использовали буферные растворы (0,05 М) с разными значениями рН: Na-ацетатный буфер (рН 3,0 -6,0), фосфатный буфер (рН 6,0-8,5), глициновый буфер (рН 8,0-9,5). Концентрация ЛО составляла 4 мкг/мл.

Определение зависимости активности ЛО от температуры осуществляли по потреблению кислорода с помощью закрытого тefлоновой плёнкой платинового электрода типа Кларка в термостатируемой ячейке при рН=8,0, температурах от 5 до 45 °С.

Энергию активации определяли путем обработки результатов изучения зависимости активности ЛО от температуры (от 5 до 45 °С). Для этого использовали уравнение Аррениуса:

$$\lg V = - \frac{E}{2,303RT} + A,$$

где: V - максимальная скорость реакции, R - газовая постоянная (1,987 кал/моль·град), A - постоянная интегрирования, T - температура в °К.

Определение термостабильности ЛО. Фермент (в концентрации 4 мкг/мл) инкубировали в трис-НСl буфере (рН 7,8; 25 мМ) в течение 1 ч при температурах 20, 28, 37, 50, 60 или 70 °С, после чего измеряли активность фермента спектрофотометрически при 22 °С.

Определение устойчивости к действию детергентов, хаотропных агентов и протеолитических ферментов. Раствор ЛО (10 Е/мл) в 25 мМ трис-НСl буфере инкубировали при 37 °С в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) (6%) или мочевины (6 М), или гуанидинхлорида (3%), или протеаз. Концентрация трипсина, химотрипсина или проназы составляла 2 мг/мл.

Характеристика ПМР спектров. ПМР-спектры снимали в растворителе – D₂O на приборе Avans-600, Bruker BioSpin. Работа выполнена д.б.н., проф. Кутышенко В.П. (лаборатория ЯМР-исследований биосистем, ИТЭБ РАН, г. Пущино).

Влияние аэрации, температуры и рН на биосинтез ЛО изучали в ферментерах усовершенствованной конструкции на основе АНКУМ-2М (общий объем 3 л, рабочий объем – 1,5 л), сконструированных специально для выращивания мицелиальных грибов. Для предотвращения пенообразования использовали безбарботажную подачу воздуха или механический пеногаситель; рО₂ поддерживали путем регулирования числа оборотов мешалки и подачи воздуха; рН, в случае необходимости, регулировали путем титрования 10%-ными растворами НСl или NaOH.

Определение кинетических параметров ЛО. Зависимость активности фермента от концентрации L-лизина проводили при концентрации ЛО, равной 4 мкг/мл. Концентрацию лизина варьировали от 0,5 до 100 мкМ. Скорость окислительного дезаминирования L-лизина определяли спектрофотометрически при $\lambda=450$ нм (двулучевой спектрофотометр CF-4 DR Optica Milano, Италия). Реакцию проводили в 0,05 М трис-НСl буфере (рН 7,8) при температуре 37 °С и ионной силе раствора, равной 0,1 М NaCl. Для увеличения точности измерения начальной скорости реакции и уменьшения начального периода обнаружения реакции использовали специальное устройство для быстрого перемешивания (Крупяноко, 1990, 2015).

Относительную активность ЛО (A , %) определяли по формуле: $A = v_{\text{ан}} \cdot 100/v_0$.

Среднее квадратичное отклонение (5 повторностей) для v_0 были равны $\pm 2,5\%$, для $S_{0,5}^k$, V и h равны $\pm 10\%$ (Sigma Plot 10, США) (Крупяноко, 2007).

Для определения субстратной специфичности использовали L – изомеры лизина, лейцина, фенилаланина, аланина, аспарагина, гистидина, орнитина, глутамина, треонина, тирозина, изолейцина, валина, а также глицин, D-лизин и 2,6-диаминопимелиновую кислоту. Концентрация субстратов составляла 0,5 мМ, ЛО – 4,0 мкг/мл.

Изучение антимикробного действия проводили согласно требованиям Государственной фармакопеи РФ. Использовали следующие тест-микроорганизмы: *Bacillus subtilis* ВКМ В-720, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ГИСК 453, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus durans* ВКМ В-603, *Clostridium sporogenes* ГИСК 272, *Aspergillus niger* ВКМ F-1119, *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-1249. Кроме того, были протестированы 2 фитопатогенных гриба: *Fusarium decemcellulare* ВКМ F-1179 и *Rhizoctonia solani* ВКМ F-895. Указанные тест-микроорганизмы были получены из ВКМ (ИБФМ РАН), а также РУДН и ГОУ «Российский онкологический научный центр» им. Н.Н. Блохина для исследований в рамках совместного проекта.

Испытания проводили на жидких и агаризованных питательных средах. Использовали тиогликолевую, соево-казеиновую среды, среду Сабуро, Ридер и среду 5/5. Испытания проводили в трех повторностях.

Для определения антимикробного действия на агаризованной среде готовили стерильные диски из фильтровальной бумаги, на которые наносили стерильную ЛО (~1 Е), L-лизин (10 мкМ), каталазу (10 Е) и просушивали в стерильном боксе. На чашки Петри с агаризованной средой 5/5 засеивали (посев «газоном») тестовые культуры микроорганизмов, после чего на поверхность агаризованной среды раскладывали подсушенные диски с нанесенными компонентами (ЛО, L-лизин, каталаза) и инкубировали при температуре 32 °С в течении 1 сут.

Определение пероксида водорода в культуральной жидкости проводили по изменению поглощения *o*-дианизидина в присутствии пероксидазы на спектрофотометре «Shimadzu-160» ($E_{436} = 8,3 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) (Березов и др., 1987; Аринбасарова и др., 2012).

Протеолитическую активность в ростовой среде определяли с использованием окрашенного казеина (Alarcon *et al.*, 2002).

Определение пипеколиновой кислоты. Метаболит экстрагировали из культуральной жидкости гриба этилацетатом (1:10, об. : об.). Экстракт высушивали, осадок растворяли в метаноле и анализировали с помощью масс-спектрометрии (Finnigan LCQ Advantage MAX, Германия). Масс-спектрометрический анализ проведен Баскуновым Б.П. (ИБФМ РАН).

Образование АФК в клетках определяли с помощью флуоресцентного красителя дигидро-2',7'-дихлорофлуоресцеина диацетата на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4 (Япония) (λ возбуждения = 485 нм, λ эмиссии = 528 нм) (Yang *et al.*, 2011).

Лиофилизацию ЛО осуществляли в аппарате для лиофильной сушки ЛС 500 («Проинтех», Россия). Конденсор охлаждали до -40 °С, разряжение в камере составляло -5 атм. Процесс лиофилизации проводили в течении 2-х сут.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Отбор активного штамма–продуцента ЛО. Из 14 штаммов рода *Trichoderma*, полученных из ВКМ (ИБФМ РАН) (см. Материалы и методы), и 8 изолятов грибов из образцов почв лесного массива г. Пушино было выявлено 4 штамма, продуцирующие ЛО: *T. aureoviride* Rifai ВКМ F-2026, *T. viride* Pers. ВКМ F-2721, *T. virens* ВКМ F-1117, а также почвенный изолят *Trichoderma* sp. 6. Синтез ЛО обнаруживался только на среде, содержащей пшеничные отруби (таблица 1).

Наибольший синтез ЛО при твердофазной ферментации отмечался у *Trichoderma* sp. 6, который в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5 %) достигал 60 Е/г субстрата. В присутствии других солей (в концентрациях от 2 до 10 %) уровень активности ЛО был в несколько раз ниже.

Наиболее активный штамм-продуцент *Trichoderma* sp. 6 был идентифицирован и депонирован в ВКМ (ИБФМ РАН) как *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D.

Таблица 1 – Синтез внеклеточной ЛО при твердофазном культивировании грибов *Trichoderma* на пшеничных отрубях. Культивирование проводили при 28 °С

Штамм-продуцент	Активность ЛО, Е/г субстрата					
	контроль	NaNO ₃	KNO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ H ₂ PO ₄	NH ₄ NO ₃
<i>T. aureoviride</i> ВКМ F-2026	2	15	10	10	10	20
<i>T. viride</i> ВКМ F-2721	2	20	10	15	10	20
<i>T. virens</i> ВКМ F-1117	1	10	10	5	5	15
<i>Trichoderma</i> sp. 6.	5	25	20	60	15	30

Оптимизация процесса биосинтеза ЛО в условиях глубинного культивирования

Состав среды культивирования (опыты в колбах). Было проведено погруженное культивирование 4-х отобранных штаммов-продуцентов на среде Чапека с различными источниками углерода: глюкозой или крахмалом, или сахарозой, или кукурузным экстрактом. Использовались также среды, содержащие сусло, или мальтозу, семена различных злаковых или отруби.

В условиях глубинного культивирования синтез ЛО наблюдался только у 2-х из 4-х, указанных в таблице 1 штаммов: *T. aureoviride* ВКМ F-2026 и *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D. Для этих штаммов глубинное культивирование оказалось более эффективным, чем поверхностная (твердофазная) ферментация. Следует также отметить, что синтез ЛО наблюдался только на средах, содержащих семена злаковых или отруби (таблица 2). Наибольший синтез отмечался при росте грибов на ржаных или пшеничных отрубях.

Таблица 2 – Синтез ЛО грибами *Trichoderma* при культивировании на семенах или отрубях различных злаковых культур. Среда роста содержала 5% (NH₄)₂SO₄ (28 °С)

Субстрат	Активность, Е/г субстрата	
	<i>T. aureoviride</i> ВКМ F-2026	<i>T. cf. aureoviride</i> Rifai ВКМ F-4268D
Отруби пшеничные	87	104
Отруби ржаные	67	85
Пшеница (<i>Triticum durum</i>)	12	15
Кукуруза сахарная (<i>Zea mays</i>)	8	10
Рожь посевная (<i>Secale cereale</i>)	7,5	10
Пырей ползучий (<i>Elytrigia répens</i>)	5	7
Костер безостый (<i>Bromus inermis</i>)	5	7
Ячмень обыкновенный (<i>Hordeum vulgare</i>)	4,5	6
Ежа сборная (<i>Dactylis glomerata</i>)	4	6
Мятлик луговой (<i>Poa praténsis</i>)	4	6,5
Вейник наземный (<i>Calamagróstis epigéjos</i>)	2,5	5
Просо обыкновенное (<i>Panicum miliaceum</i>).	2,7	4,5
Ячмень обыкновенный (<i>Hordeum vulgare</i>)	4,5	6,0

Из результатов, представленных в таблице 3, видно, что биосинтез фермента зависел от концентрации различных солей. Лучшие результаты (8,4 Е/мл, 120 Е/г субстрата) были получены в присутствии 4 % NH_4Cl при использовании гриба *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D.

Зависимость интенсивности биосинтеза ЛО от условий культивирования, в частности, типа ферментации и присутствия солей азота, была показана японскими исследователями для гриба *T. viride* (Kusakabe et al., 1979). В условиях твердофазной ферментации добавление NaNO_3 приводило к увеличению активности в 3 раза, но в погруженной культуре биосинтез практически отсутствовал. Наоборот, биосинтез ЛО *T. harzianum* Rifai протекал более эффективно в погруженной культуре (Лукашева и др., 2002).

Для дальнейшего изучения биосинтеза ЛО в погруженной культуре был использован штамм *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D, а в качестве субстрата роста - пшеничные отруби.

Таблица 3 – Влияние источника неорганического азота на синтез ЛО *T. aureoviride* ВКМ F-2026 *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D в условиях погруженного культивирования

	Концентрация солей, %	Активность, Е/г отрубей	
		<i>T. cf. aureoviride</i> Rifai ВКМ F-4268D	<i>T. aureoviride</i> ВКМ F-2026
контроль	0	5	5
NaNO_3	2	30	25
	4	50	40
	6	75	50
	8	20	15
NH_4NO_3	2	30	25
	4	80	70
	6	90	80
	8	50	40
NH_4Cl	2	80	55
	4	120	85
	6	75	70
	8	45	40
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	40	30
	4	95	50
	6	75	50
	8	30	20
NaCl	2	25	25
	4	70	65
	6	115	82
	8	20	20

На рис. 1 представлены результаты сравнительного изучения биосинтеза фермента на пшеничных отрубях в присутствии (А) и в отсутствии (Б) NaCl в условиях погруженного культивирования. Так, в присутствии 6 % NaCl (ионная сила при этом составляла ~ 1 М) появление активности ЛО отмечалось уже на 2 сут культивирования и достигало максимального уровня (8 Е/мл) на 11–12 сут (рис. 1А). Без добавления NaCl активность внеклеточной ЛО практически отсутствовала (рис. 1Б).

Следует отметить, что концентрации солей, определенные как оптимальные для биосинтеза ЛО (таблица 3), соответствуют ионной силе, равной ~ 1 М. Указанные условия (присутствие солей) можно считать условиями солевого стресса, которые и провоцируют синтез ЛО у гриба. Кроме того, другие соли, а именно: KCl, MgCl_2 , а также Na_2SO_4 в сопоставимых концентрациях также стимулировали биосинтез фермента.

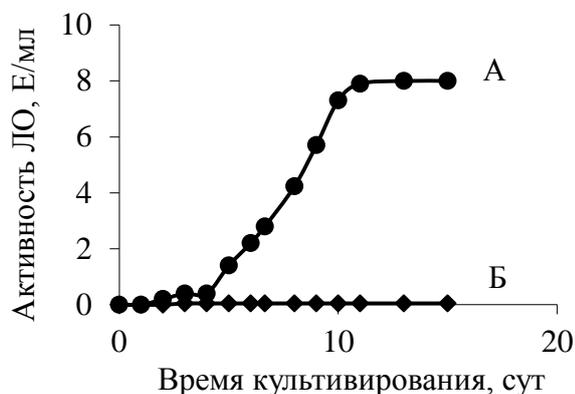


Рисунок 1 – Синтез ЛО при культивировании гриба *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D на пшеничных отрубях в присутствии 6 % NaCl (А) и в отсутствии солей (Б) в условиях погруженного культивирования.

В связи с перспективой масштабирования процесса получения ЛО дальнейшую оптимизацию процесса биосинтеза ЛО проводили в биореакторах лабораторного типа на основе АНКУМ-2М объемом 3 л (рабочий объем – 1,5 -2,0 л).

Влияния аэрации

Культивирование осуществляли на среде, содержащей 4 % NH_4Cl , при температуре 28°C без регулирования рН (без подтитровки). Результаты влияния аэрации на биосинтез фермента представлены на рис. 2. Можно видеть, что наиболее активный синтез ЛО (9 Е/мл или 128 Е/г субстрата) происходил при $p\text{O}_2$, равном 70-80 % от насыщения (при $p\text{O}_2$, равном 80%, число оборотов достигало 1100/мин, подача воздуха – 1,4 л/мин). При меньшем $p\text{O}_2$ биосинтез ЛО был гораздо ниже. Во всех случаях наибольшее потребление кислорода были зафиксированы на 4-6 сут ферментации, что, вероятно, обусловлено наибольшими ростом и дыхательной активностью культуры.

Влияние рН

Изучение влияния рН на биосинтез ЛО проводили при $p\text{O}_2$, равном 70-80 % от насыщения, и температуре 28 °С. При естественном рН, без подтитровки, в течение первых 4-х сут имело место сначала закисление среды от рН 5,8 до 4,5, затем постепенное защелачивание до рН 7,8. Начало процесса защелачивания совпадало с появлением активности ЛО в среде. Удерживание рН на уровне 5,8 не приводило к накоплению фермента выше 85 Е/г субстрата (6 Е/мл). При поддержании значений рН в ферментере не ниже 5,8 позволило получить максимальное накопление фермента до уровня 114 Е/г (8 Е/мл). Лучшие результаты получены в случае регулирования рН: при поддержании его значения на уровне не выше 6,0. При этом в среде накапливалось до 142 Е/г субстрата (10 Е/мл).

Влияние температуры

На рис. 3 представлены результаты изучения влияния температуры на биосинтез ЛО в ферментерах при контролируемых параметрах $p\text{O}_2$ и рН: аэрацию во всех исследуемых случаях поддерживали на уровне $p\text{O}_2$, равном 70-80% от насыщения, рН не регулировали (без подтитровки). На начальных этапах роста наибольший биосинтез наблюдался при 37 °С (рис. 3-А), но после 6-8 сут ферментации процесс заканчивался, дальнейшего накопления ЛО в реакционной среде не наблюдалось. При 24 °С (рис. 3-В) накопление ЛО происходило медленно, длительность процесса увеличивалась до 15 сут. Наибольшее накопление целевого продукта в культуральной среде происходило при 28 °С, к 11–12 сут в реакционной среде накапливалось до 10 Е/мл (142 Е/г субстрата) (рис. 3 - Б).

С учетом этих результатов (рис. 2, 3) и результатов опытов в колбах (данные не представлены) были проведены дополнительные исследования по выбору оптимального температурного режима биосинтеза ЛО: 1) 28 °С в течение первых 6 сут, 24 °С по 15 сут; 2)

24 °С в течение первых 6 сут, 28 °С по 15 сут; 3) 37 °С в течение первых 6 сут; 32 °С по 15 сут; 4) 37 °С в течение первых 6 сут; 24 °С – с 6 по 15 сут.

Наибольший биосинтез целевого продукта наблюдали в случае следующей смены температуры в ходе процесса: температуру ферментации в течение первых 6 сут поддерживали на уровне 37 °С, после чего переключали на 24°С. При этом время культивирования составило 12 сут, в реакционной среде накапливалось до 172 Е/г субстрата (12 Е/мл). Другие указанные режимы были менее эффективны.

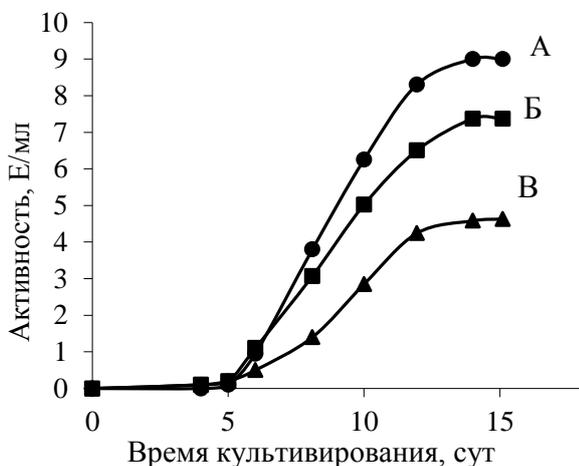


Рисунок 2 – Биосинтез ЛО в биореакторе при различной аэрации (pO_2). 28 °С, рН – без подтитровки.
А – 80 %; Б – 55 %; В – 30%

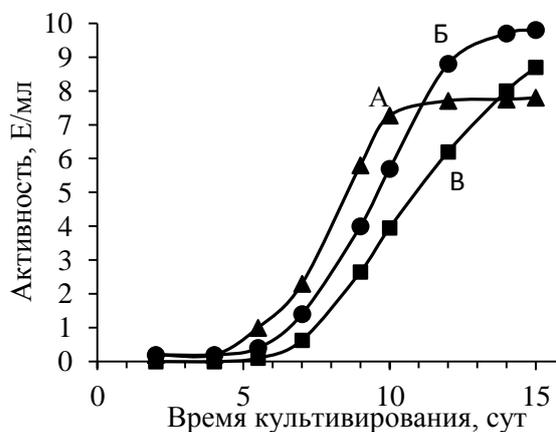


Рисунок 3 – Биосинтез ЛО в биореакторе при различной температуре. pO_2 70 – 80%, рН – без подтитровки.
А – 37 °С; Б – 28°С; В – 24 °С.

Таким образом, показано, что погруженное культивирование - более эффективно, чем поверхностная (твердофазная) ферментация. Обнаружено, что оптимальным субстратом для роста и биосинтеза фермента являются пшеничные отруби, причем биосинтез фермента значительно зависел от присутствия солей в концентрации ≈ 1 М. Определены оптимальные режимы аэрации (pO_2), рН и температуры для синтеза ЛО грибом *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D в биореакторах лабораторного типа. В найденных оптимальных условиях получен высокий уровень биосинтеза ЛО, что предполагает в дальнейшем масштабирование процесса.

Очистка ЛО

Для очистки фермента предложены и отработаны два метода.

Первый метод - очистка ЛО с помощью осаждения $(NH_4)_2SO_4$ - основан на общепринятых подходах и включает в себя 2-х стадийное осаждение ЛО с помощью сульфата аммония с дальнейшей очисткой при помощи гидрофобной и ионообменной хроматографии (таблица 4). В основе второго метода лежит связывание и осаждение фермента Cu^{2+} имидазольным комплексом, с последующей очисткой при помощи гидрофобной и ионообменной хроматографии, как и в первом случае (таблица 5).

Метод, представленный в таблице 4, позволил получить гомогенный препарат с удельной активностью 100 Е/мг белка и выходом 60 %.

Чистота препарата ЛО была подтверждена с помощью электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 4).

С целью повышения эффективности процесса получения целевого продукта был разработан более технологичный способ выделения и очистки ЛО, основанный на обратимом связывании фермента с ионами меди (таблица 5).

Оригинальность технического решения заключалась в том, что вместо общепринятых методов осаждения фермента из КЖ сульфатом аммония, этанолом, ацетоном или другими агентами, ЛО осаждали с помощью медь-имидазольного комплекса.

Таблица 4 – Очистка ЛО с помощью осаждения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Стадия	Общий белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Культуральная жидкость	25 000	10 000	0,4	0	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 30-60% от насыщ.	3 000	9 000	3,0	7,5	90
Октил-сефароза CL-4В	150	7 500	50	150	75
DEAE- Тоуорpearl HW-55	55	5 445	99	248	60

Таблица 5 – Очистка ЛО с помощью Cu - имидазольного осаждения

Стадия очистки	Общий белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е /мг белка	Степень очистки	Выход, %
Культуральная жидкость	25 000	10 000	0,4	0	100
Cu-имидазол, 10 мМ	1780	9500	6,4	16	95
Гидрофобная хроматография на октил-сефарозе	216	7800	36	90	78
Ионообменная хроматография DEAE- Тоуорpearl HW-55	65	6500	100	250	60

После отделения отрубей и мицелия к КЖ при активном перемешивании добавляли Cu-имидазольный комплекс (до конечной концентрации 10 мМ) и инкубировали в течение 2 ч. Образовавшийся осадок, содержащий ЛО, собирали центрифугированием при 6000 g в течение 30 мин и растворяли в 100 мл 50 мМ ЭДТА (pH 7,0). Нерастворимые компоненты осадка удаляли путем последующего центрифугирования при 10000 g в течение 20 мин. К супернатанту добавляли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 25% от насыщения и 1 М трис-НСl буфер до концентрации 25 мМ (pH 7,5) и оставляли на 1 ч при 4 °С. Фермент, находящийся в супернатанте, подвергали дальнейшей очистке, включающей гидрофобную хроматографию на октил-сефарозе и ионообменную хроматографию на DEAE- Тоуорpearl HW-55, как описано выше.

Метод, представленный в таблице 5, позволил получить гомогенный препарат с удельной активностью, равной 100 Е/мг белка, и выходом - 60 %.

Чистота препарата ЛО была подтверждена с помощью электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 5).

Следует отметить, что использование данного подхода по сравнению с традиционным осаждением сульфатом аммония, позволяет уменьшить объем обрабатываемой жидкости (в 100 раз), а также сократить число стадий выделения (дробное осаждение ЛО сульфатом аммония), что предполагает существенное снижение себестоимости продукта по сравнению с мировыми аналогами.

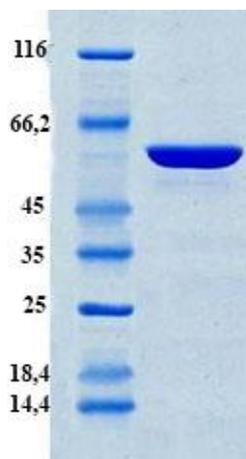


Рисунок 4 – Электрофореграмма препарата ЛО, полученного методом осаждения сульфатом аммония.

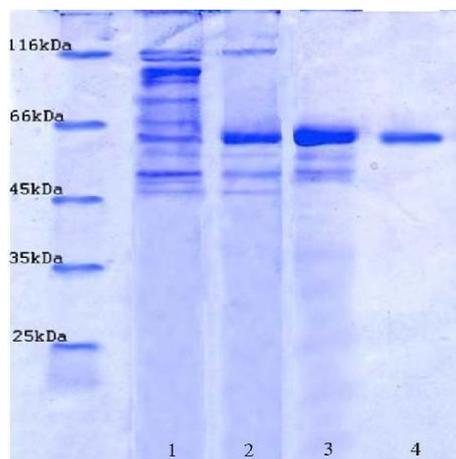


Рисунок 5 – Электрофореграмма препаратов ЛО, очищенных с помощью осаждения ионами меди. 1 – культуральная жидкость на 12 сут роста, 2 – супернатант, полученный после растворения осадка ЛО с ионами меди в 50 мМ ЭДТА, 3 – элюат после гидрофобной хроматографии, 4 – гомогенный препарат ЛО после ионообменной хроматографии.

Свойства ЛО

Молекулярная масса

С помощью электрофореза в нативных условиях в градиенте ПААГ определена молекулярная масса ЛО, составляющая 117 кДа.

Методом денатурирующего электрофореза в ПААГ была определена масса субъединиц (рис. 4). Наличие одной полосы говорит о том, что выделенная нами ЛО из *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D является гомодимером. Эти результаты согласуются с результатами, полученными для аналогичных ферментов из других видов *Trichoderma* (Лукашова и др., 2002).

Спектральные характеристики

Спектр выделенного фермента ЛО оказался типичным для флавопротеина с максимумами при 278, 390 и 465 (плечо 490) нм (рис. 7А и Б, кривые 1). В присутствии лизина пики при 390 и 465 нм исчезали (рис. 7 Б, кривая 2). Через 5-6 минут после исчерпания лизина в среде измерения в присутствии кислорода спектр полностью восстанавливался. Эти данные свидетельствуют о том, что в качестве протетической группы ЛО выступает флаavin, который при связывании фермента с субстратом обратимо меняет свое состояние - из окисленного в восстановленное.

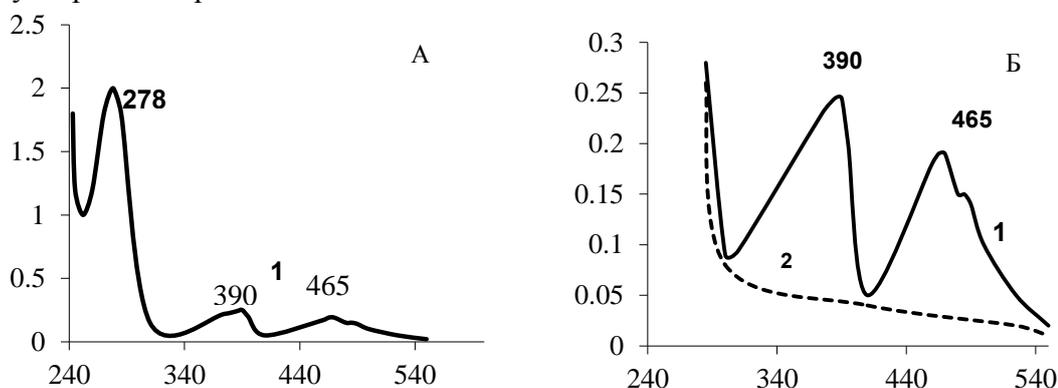


Рисунок 7 – Спектр поглощения ЛО (0,5 мг/мл ЛО в трис-НСl, 0,025 М, рН 8,0). А – в отсутствии лизина; Б – в присутствии лизина (0,5 мМ).

По результатам ВЭЖХ анализа время выхода пика вещества, содержащегося в указанном супернатанте, полностью совпадало со временем выхода стандартного препарата ФАД.

Для количественного определения простетической группы фермента ЛО был проанализирован супернатант, полученный после денатурирования ЛО (2 мг). Спектры супернатанта были идентичны спектрам ФАД. Измеренное количество ФАД составляло 39,2 нмоль ($E_{436}=11,0 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$), что соответствовало 2 молекулам ФАД на 1 молекулу фермента.

Зависимость активности ЛО от рН

Из результатов, представленных на рис. 8, видно, что максимальная активность ЛО проявлялась в широком диапазоне значений рН: от 4,5 до 9,0.

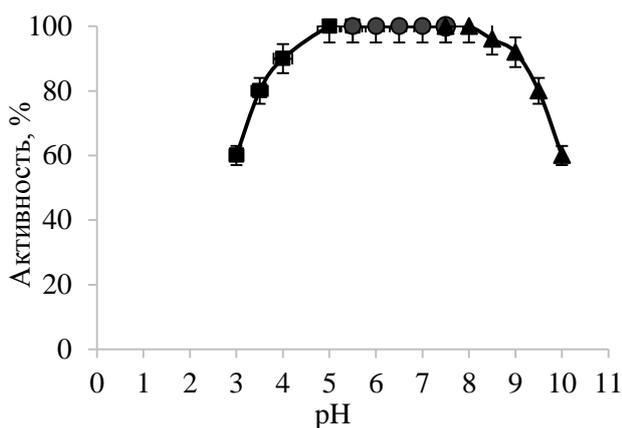


Рисунок 8 – Влияние рН на активность ЛО (полярографический метод).

■--■ рН 3,0 – 6,0; 0,05 М натрий-ацетатный буфер,

●--● рН 6,0 – 8,5; 0,05 М трис-фосфатный буфер;

▲--▲ рН – 8,0 – 9,5; 0,05 М глициновый буфер.

Зависимость активности ЛО от температуры

На рис. 9А представлены данные, характеризующие зависимость активности ЛО от температуры. Видно, что температурный оптимум ЛО соответствует 37 °С, что коррелирует с температурным оптимумом ЛО из *T. viride* (Kusakabe *et al.*, 1979) и других видов грибов (Weber *et al.*, 1994; Смирнова и др., 2009).

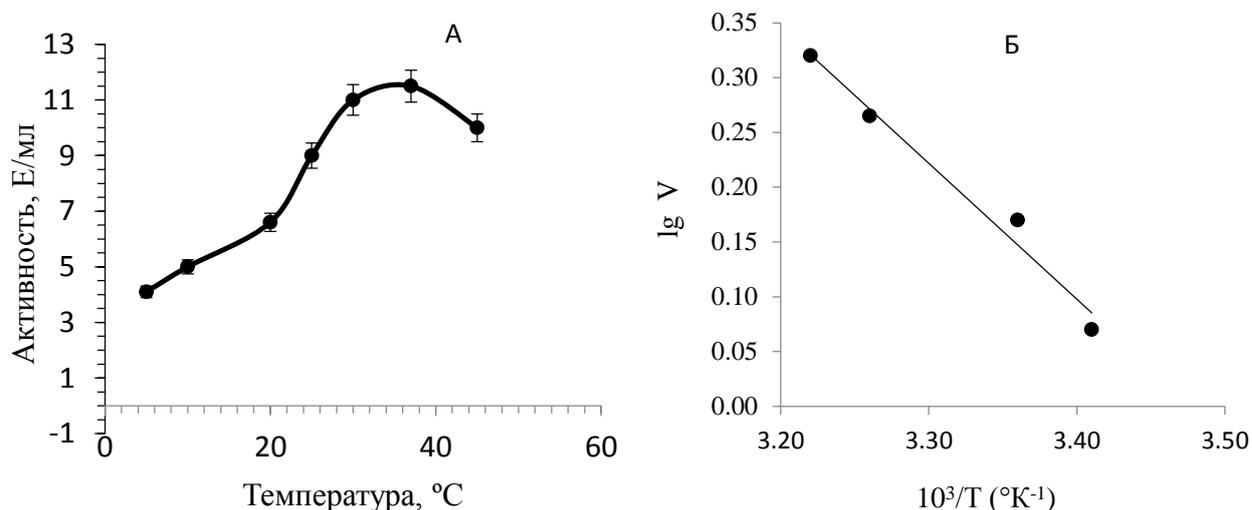


Рисунок 9 – Зависимость активности ЛО от температуры.

А – в прямых координатах, Б - в координатах Аррениуса.

Для определения энергии активации данные, представленные на рис. 9А, были преобразованы в координатах Аррениуса (рис. 9Б). Обработка этих данных позволила рассчитать энергетический барьер реакции дезаминирования L-лизина, $E_a = 2,61 \text{ ккал/моль}$. Такая низкая энергия активации свидетельствует о высокой каталитической активности фермента.

Полученная термодинамическая характеристика фермента ЛО в настоящее время является единственной среди таковых для оксидаз аминокислот.

Зависимость активности ЛО от ионной силы раствора

Максимальная активность отмечалась при $I = 0,225$; концентрация NaCl при этом соответствовала 0,22-0,23 М, что близко по значению к концентрации физиологического раствора, 0,9 % (рис.10).

В литературе отсутствуют данные по изучению зависимости активности подобных ферментов от ионной силы растворов.

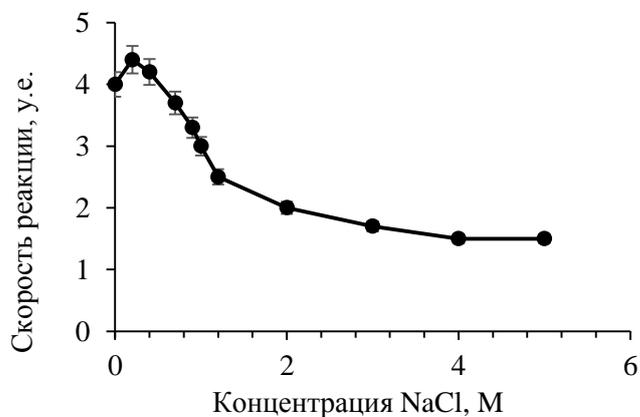


Рисунок 10 – Зависимость начальной скорости реакции (v_0) от концентрации NaCl.

Субстратная специфичность

Показано, что фермент действует практически только на L-лизин. Незначительную активность отмечали с аргинином (5,8 %) и L-орнитином (8,3 %), а также производного лизина, 2,6-диаминопимелиновой кислоты (22 %). Другие аминокислоты, обычные в составе белков, а также D-лизин не окислялись.

Таким образом, ЛО является высокоизбирательным и L-стереоспецифичным ферментом, что обеспечивает перспективу его использования для создания биохимических тестов на L-лизин, а также в биоинженерии белков.

Стабильность ЛО

Результаты изучения стабильности фермента суммированы в таблице 6. Показано, что фермент стабилен в диапазоне температур от 20 до 50 °С. Повышение температуры приводило к частичной (50–60 °С) или полной (73 °С) потере активности фермента, что, вероятно, обусловлено денатурацией белковой молекулы.

Установлено, что фермент ЛО устойчив к действию протеолитических ферментов. После 10 сут инкубирования в присутствии проназы (2 мг/мл) сохранялось 60 % от начальной активности, в присутствии трипсина или химотрипсина (2 мг/мл) - соответственно 75 % и 70 %.

Полученные результаты коррелируют с другими сообщениями о наличии устойчивости к протеазам у других оксидаз L-аминокислот (Butzke *et al.*, 2005).

При изучении устойчивости ЛО к действию детергентов и 6 М мочевины полярографическим методом показано, что ДСН, твин-80, тритон X-100 и мочевина не оказывали влияния на активность ЛО в течение всех 3 ч инкубации. Заметное снижение активности ЛО отмечалось только в присутствии гуанидинхлорида (через 2 ч инкубации отмечалось полное падение активности).

Следует добавить, что измерение активности ЛО после 2-х лет хранения в лиофилизированном состоянии при -18 °С показало практически полное сохранение активности (95 %).

Установленная высокая стабильность молекулы фермента согласуется с данными, изучения структуры ЛО методом протонного магнитного резонанса.

Таким образом, ЛО является стабильным ферментом. Устойчивость к действию температуры, pH, протеолитических ферментов, детергентов, а также высокое сродство к лизину

и узкая субстратная специфичность характеризуют его потенциал, как в природном окружении, так и для использования в медицинских исследованиях.

Таблица 6 – Характеристики стабильности L-лизин- α -оксидазы

<i>Параметр</i>	<i>Свойства</i>
рН-оптимум	4,5-9,0
Структура (ПМР)	α -спиральные участки – 60 %; β -структурные участки – 40 %.
Термостабильность	20-50 °С – 100 % от начальной активности 10 °С – 35 % от начальной активности
Хранение ЛО	5 сут (раствор ЛО при 37 °С) – 100 % сохранение активности 2 года в лиофилизованном состоянии (-18 °С) – 95-100% сохранение активности
<i>Факторы воздействия</i>	<i>Активность, % от начальной активности</i>
Проназа (2 мг/мл)	10 сут – 60 % от начальной активности
Химотрипсин (2 мг/мл)	10 сут – 70 % от начальной активности
Трипсин (2 мг/мл)	10 сут – 75 % от начальной активности
ДСН (3 %)	3 ч – 98 % от начальной активности
Твин 80 (3%)	3 ч – 100 % от начальной активности
Тритон X-100 (3%)	3 ч – 97 % от начальной активности
Мочевина (6 - 8 М)	3 ч – 99 % от начальной активности
Гуанидинхлорид (1%)	1 ч – 30 % от начальной активности, (2 ч - 0%).

Спектр протонного магнитного резонанса и КД

Выявлено, что спектр протонного магнитного резонанса является характерным для глобулярных белков с молекулярной массой более 40 кДа. В области 6 – 5,5 мд имеются небольшие по интенсивности сигналы, принадлежащие α -СН протонам, находящимся в β -структурных участках полипептидной цепи.

Спектр КД в ближнем ультрафиолете (260 – 280 нм) отражает пространственную анизотропию колец ароматических аминокислотных остатков, связанную с образованием гидрофобных кластеров внутри глобулы и появлением третичной структуры при сворачивании полипептидной цепи. Спектр поглощения в широкой области 200 – 600 нм, позволяет выделить несколько максимумов (300 – 500) нм, принадлежащих хромофорам, которые окрашивают раствор белка.

Спектр КД в дальнем ультрафиолете (190 – 240 нм), отражающий вторичную структуру полипептидной цепи, показал наличие α -спиральных и β -структурных участков. Высокое содержание последних (40% белковой молекулы) обеспечивает высокую стабильность ЛО: устойчивость к действию температуры, детергентов и протеолитических ферментов (табл. 6).

Кинетические параметры

На рис. 11 представлена зависимость скорости реакции дезаминирования лизина от концентрации фермента (при избытке субстрата). Можно видеть, что при концентрациях ЛО до 4,5 мкг/мл эта зависимость имеет линейный характер. В пределах этих концентраций ЛО были проведены все последующие кинетические исследования.

Была исследована также зависимость скорости реакции от концентрации лизина (рис. 12). Функция насыщения фермента субстратом представлена в виде сигмоидной кривой. Так как ЛО является гомодимерным ферментом, то его кинетика должна описываться трехпараметрическим уравнением Хилла с учетом кооперативности связывания субстрата:

$$v_0 = V \cdot s^h / (s^h + s_{0,5}^h)$$

где v_0 – начальная скорость реакции, V – максимальная скорость реакции, $S_{0.5}$ – концентрация субстрата, при которой скорость реакции равна половине от V , h – коэффициент Хилла.

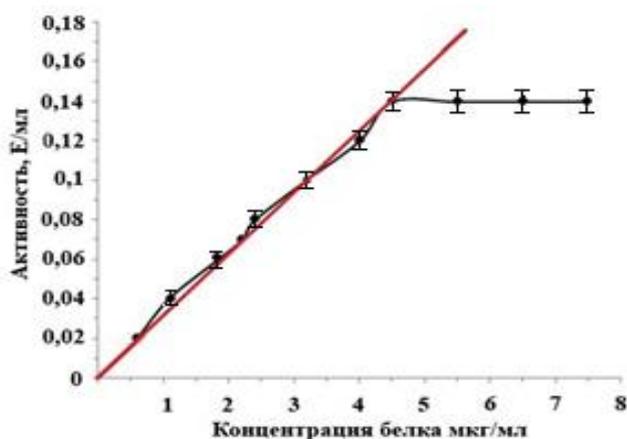


Рисунок 11 – Зависимость активности ЛО от ее концентрации.

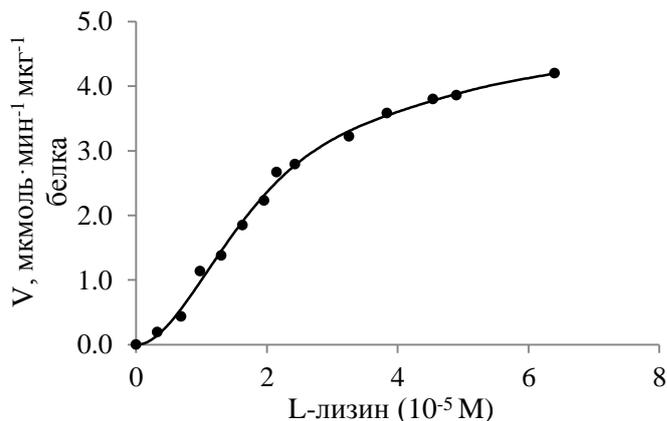


Рисунок 12 – Зависимость скорости реакции от концентрации лизина.

Обработка данных с помощью программы «Statistics» (SigmaPlot 10) позволила получить следующие результаты: $h = 2,05 \pm 0,15$, $V = 4,36 \pm 0,14$ мкмоль·мин⁻¹·мг⁻¹белка и $s_{0.5} = 2,03 \pm 0,07 \cdot 10^{-5}$ М. h показывает положительную кооперативность участия двух субъединиц в образовании субстрат-ферментного комплекса.

Для оценки K_m было использовано уравнение, выведенное ранее для кооперативных (аллостерических) ферментов с использованием коэффициента Хилла (Кручанко, 2014):

$$K_{m(A)} = S_{0.5(A)}/h = S_{0.5(A)}/(1+1).$$

Подстановка экспериментальных данных из рис. 12 в это уравнение позволило вычислить константу Михаэлиса: $K_{m(A)} = 1,015 \cdot 10^{-5}$ М. Полученное значение K_m указывает на высокую прочность связывания субстрата с активным центром каждой субъединицы ($\sim 10^{-5}$ М).

Высокая активность, высокое сродство к субстрату и узкая субстратная специфичность являются существенными характеристиками не только для потенциального медицинского препарата ЛО, но также для определения возможной функциональной роли внеклеточного фермента для продуцента.

Функциональная роль ЛО

Микроорганизмы постоянно «контролируют» свое окружение в природных условиях.

Анализ экзометаболитов (в динамике) позволяют определить наиболее вероятные функции клетки в регулировании природной окружающей среды.

Показано, что процесс синтеза ЛО грибом *Trichoderma* на средах, содержащих отруби или семена злаковых (таблица 2), сопровождался накоплением в ростовой среде H_2O_2 –продукта ферментативного окислительного дезаминирования L-лизина (рис. 13), а также внеклеточных протеолитических ферментов, гидролизующих белковые компоненты пшеничных отрубей и обеспечивающих поступление в среду роста аминокислот, в том числе лизина.

Был проведен анализ аминокислотного состава среды культивирования гриба, синтезирующего ЛО. В результате действия внеклеточных протеаз через 1 сут культивирования в среде обнаруживалось более 10 аминокислот. Следует отметить, что L-лизин обнаруживался только на 1-2 сут роста. Отсутствие лизина после первых сут культивирования, вероятно, можно объяснить тем, что освобождающийся лизин интенсивно окисляется внеклеточной ЛО с образованием пероксида водорода.

Наряду с различными аминокислотами, протеазами и H_2O_2 в среде роста была обнаружена пипеколиновая кислота (в концентрации до 20 мкМ) (рис. 14). Это соединение было идентифицировано с помощью масс-спектрометрии (Finnigan LCQ Advantage MAX, Германия).

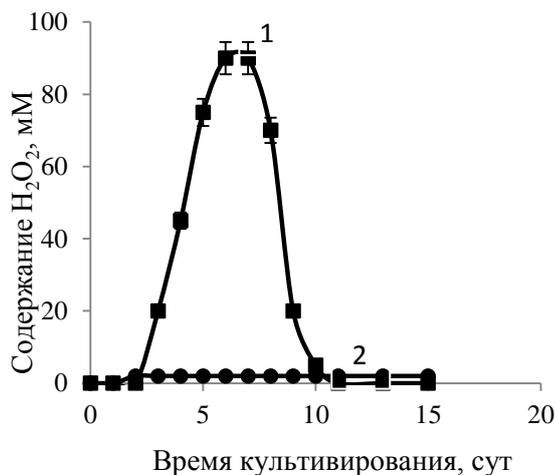


Рисунок 13 – Содержание H_2O_2 в среде культивирования гриба, в присутствии (1) и в отсутствие (2) NH_4Cl .

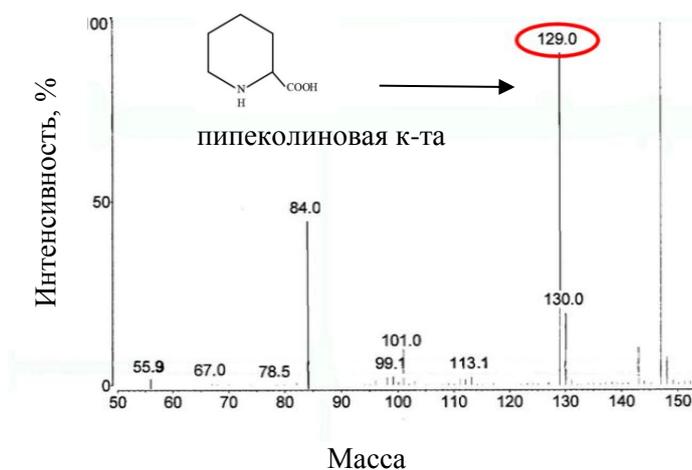


Рисунок 14 – Масс-спектрометрическая характеристика метаболита в среде роста гриба *Trichoderma*. Рост в погруженной культуре на пшеничных отрубях в присутствии NH_4Cl .

Следует особо отметить, что пипеколиновая кислота обнаруживалась в ростовой среде гриба только в условиях биосинтеза ЛО (на различных злаковых), при этом α -кето- ϵ -аминокапроновая кислота (продукт ферментативной реакции дезаминирования лизина) не была обнаружена. Образование этого соединения отмечалось в модельных опытах при непосредственном взаимодействии ЛО с лизином (в буфере), что также показано с помощью масс-спектрометрии.

Ранее было показано (Návarová *et al.*, 2012; Vogel-Adghoughet *al.*, 2013; Bernsdorff *et al.*, 2016), что H_2O_2 (или другие активные формы кислорода) и пипеколиновая кислота играют центральную роль в индукции и развитии системной устойчивости растений (SAR). Пипеколиновая кислота индуцирует синтез растительных гормонов – жасминовой и салициловой кислот, ответственных за устойчивость растения к некротрофам и биотрофам. В свою очередь, H_2O_2 (и другие активные формы кислорода) является ключевым элементом в активации митоген-активируемых протеиназ, также участвующих в иммунном ответе растений при биотических и абиотических стрессах.

Таким образом, можно предполагать, что присутствующие в окружении гриба пероксид водорода и пипеколиновая кислота определяют возможную функциональную роль внеклеточной ЛО как участие в индуцировании системной устойчивости растений и развитии иммунного ответа растений на инвазию патогена.

Антагонистическое действие ЛО

С целью охарактеризовать вероятную функциональную роль для продуцента в природных условиях нами изучено также антагонистическое действие фермента. Кроме того, выявление антимикробного действия необходимо в качестве обязательного этапа проверки образцов потенциальных лекарственных препаратов на стерильность (согласно требованиям Государственной Фармакопеи РФ).

Рост (на жидкой среде) всех тестируемых аэробных бактерий (*B. subtilis* ВКМ В 720, *E. coli* ATCC 25922, *E. durans* ВКМ В-603, *P. aeruginosa* ГИСК 453, *P. aureofaciens* ВКМ В-1249, *S. aureus* ATCC 6538-Р, и грибов (*A. niger* ВКМ F-1119, *R. solani* ВКМ F-895 и *F. decemcellulare* ВКМ F-

1179) полностью подавлялся препаратом ЛО. Следует отметить, что антимикробный эффект ЛО проявлялся как против грамположительных, так и против грамотрицательных бактерий. Рост анаэробной бактерии *C. sporogenes* в присутствии ЛО не тормозился.

На рис. 15 показано ингибирование роста грамположительных каталазоотрицательных (*E. durans* ВКМ В-603) и каталазоположительных бактерий (*B. subtilis* АТСС 6633) под действием ЛО в различной концентрации.

Антимикробное действие показано для оксидаз L-аминокислот из различных источников: животных клеток (Puiffe *et al.*, 2013; Hanane-Fadila and Fatima, 2014), грибов (Yang *et al.*, 2011) и бактерий (Lucas-Elio *et al.*, 2006). При этом обнаружено, что действующим началом могут являться не сами оксидазы, а пероксид водорода, который образуется при расщеплении соответствующего субстрата, тем самым, обеспечивая условия окислительного стресса (Lucas-Elio *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010).

Не исключено, что аналогичный механизм может определять также и антимикробное действие ЛО из *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D.

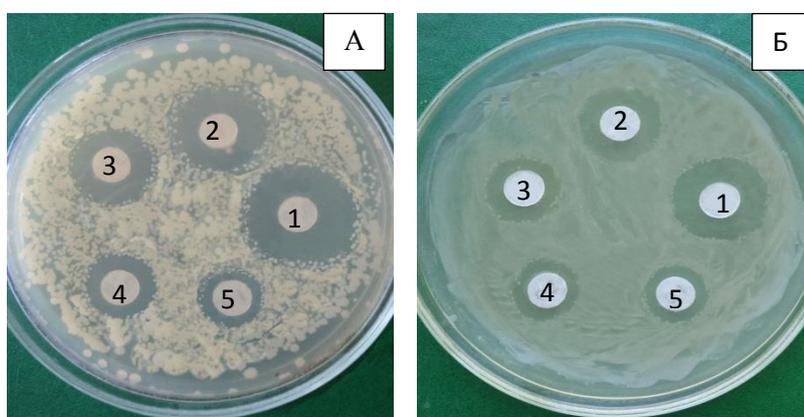


Рисунок 15 – Влияние ЛО в различной концентрации на рост бактерий *E. durans* ВКМ В-603 (А) и *B. subtilis* ВКМ В-720 (Б).
1- 5 E; 2- 1 E; 3- 0,5 E;
4-0,2 E; 5- 0,1 E.

Существуют и другие механизмы антимикробного действия оксидаз аминокислот, не связанные непосредственно с образованием активных форм кислорода в окружающей среде, а обусловленные взаимодействием оксидаз с клеточной стенкой и последующей программируемой гибелью клетки (Yang *et al.*, 2011, 2012).

Для выяснения вопроса о возможном механизме действия ЛО на микроорганизмы, в сравнительном аспекте исследовали антимикробное действие ЛО в присутствии и отсутствии каталазы при культивировании тестовых микроорганизмов на агаризованной питательной среде.

На рис. 16 А, Б, В, Г-1 можно видеть, что во всех случаях в присутствии ЛО образовывались зоны лизиса, свидетельствующие о гибели клеток.

При добавлении лизина зона лизиса на газоне каталазоотрицательной бактерии *E. durans* ВКМ В-603 увеличивалась в 4 раза (рис. 16 А-2). Последующее добавление каталазы (рис. 16 А-3) приводило к уменьшению ингибирования роста микроорганизма (уменьшение зоны лизиса).

В случае каталазоположительных микроорганизмов: *P. aureofaciens*, *S. aureus*, или *E. coli*, соответствующие эффекты при добавлении лизина и каталазы также имели место, но были менее ярко выражены (рис. 16 Б, В, Г -3).

Следует особо отметить, что во всех указанных случаях (рис. 16 А-Г, 3, 4) добавление каталазы не снимало полностью антимикробного эффекта ЛО.

Полученные результаты позволяют дифференцировать антимикробное действие ЛО, основанное на 1) образовании экзогенного пероксида водорода в результате каталитической реакции и 2) непосредственном взаимодействии ЛО с клеточной стенкой микроорганизма. При этом необходимо учитывать представленные выше результаты изучения субстратной

специфичности, а именно: проявление активности ЛО с лизином или дипаминопимелиновой кислотой, которые являются компонентам пептидогликанового слоя клеточной стенки бактерий.

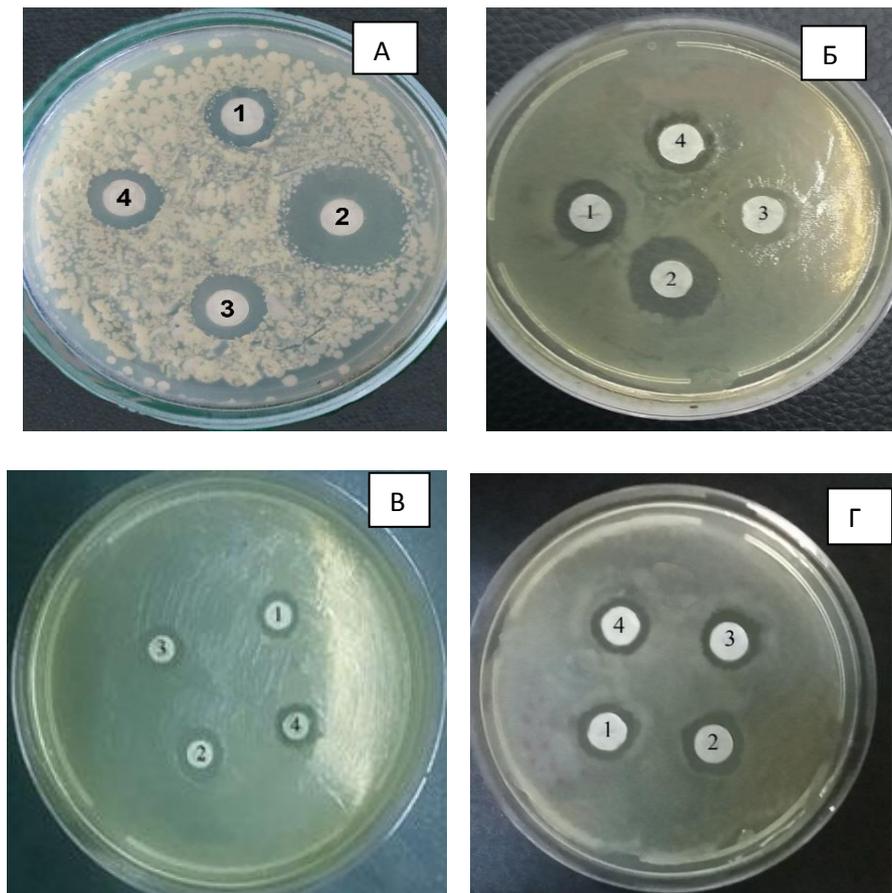


Рисунок 16 –
 Антибактериальная
 активность ЛО:
 А – *E. durans* ВКМ В-603;
 Б – *P. aureofaciens* ВКМ В-
 1249;
 В – *E. coli* ATCC 25922;
 Г – *S. aureus* ATCC 6538-Р.
 1 – ЛО (1 Е);
 2 – ЛО (1 Е) + L-лизин (10
 мкМ);
 3 – ЛО (1 Е) + L-лизин (10
 мкМ) + каталаза; (10 мкг)
 4 – ЛО (1 Е) + каталаза (10
 мкг).

В любом случае могут иметь место нарушение различных функции клеточной стенки (процессы поляризации, транспорта различных метаболитов и др.) и запуск процессов, подобных апоптозу

На рис. 17 и 18 представлены результаты, демонстрирующие накопление АФК внутри клеток бактерий *S. aureus* и фитопатогенных грибов *R. solani*. Можно видеть, что присутствие ЛО в различной концентрации приводило к увеличению флуоресценции дигидро-2',7'-дихлорофлуоресцеина диацетата в соответствии с увеличением внутриклеточной концентрации АФК. При этом имела место гибель клеток: при инкубации с ЛО в концентрации, равной 10 мкг/мл, доля мертвых клеток *S. aureus* достигала 90%-100% через 18 ч; *R. Solani* - через 48 ч. Аналогичный эффект был показан для фенилаланин-оксидазы из *T. harzianum*, ингибирующей роста гриба *R. Solani*, что было сопряжено с митохондриальной дисфункцией (выходом цитохрома *c*) и апоптозом (Yang *et al.*, 2011, 2012).

Увеличение содержания внутриклеточного уровня АФК был также показан как один из механизмов цитотоксического действия ЛО из *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D на модели клеточной линии феохромоцитомы крысы РС-12 (Лукашева и др., 2015).

Накопление АФК в бактериях и грибах, обработанных ЛО, наряду с образованием экзогенного H_2O_2 может приводить к перекисному окислению липидов (Mutoh *et al.*, 1995), повреждению и разрыву цепи ДНК (Dalton *et al.*, 1999), что также может приводить к ингибированию роста микроорганизмов.

Представленные данные позволяют полагать, что ЛО наряду с другими внеклеточными белками, протеазами и антимикробными пептидами (Аринбасарова и др., 2017) выполняет защитные функции для продуцента и обеспечивает адаптивное преимущество в конкуренции с другими организмами - бактериями и грибами.

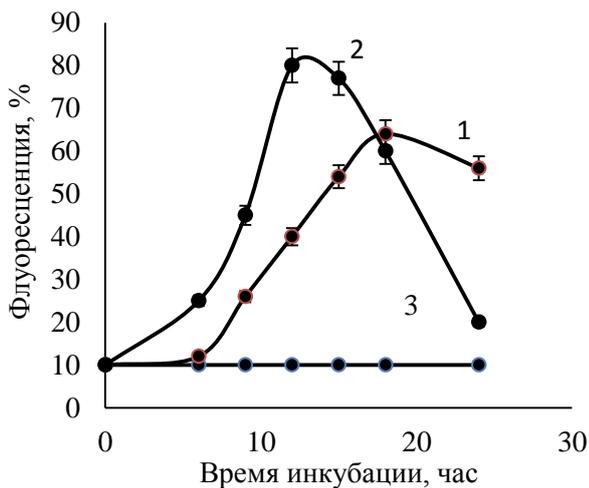


Рисунок 17 – Образование АФК у бактерий *S. aureus* в присутствии ЛО.
1) 5 мкг/мл, 2) 10 мкг/мл, 3) 0 мкг/мл.

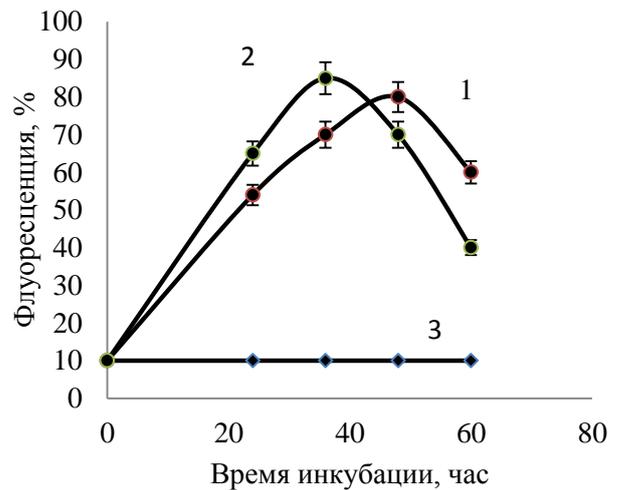


Рисунок 18 – Образование АФК у грибов *R. solani* в присутствии ЛО.
1) 5 мкг/мл, 2) 10 мкг/мл, 3) 0 мкг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием найденного активного штамма-продуцента *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D создан и отработан эффективный процесс биосинтеза ЛО на лабораторном уровне. Создана эффективная схема получения фермента, включающая метод очистки фермента, основанный на осаждении его с помощью комплексных солей меди и позволяющий получать гомогенный препарат ЛО с высокой удельной активностью – 100 Е/мг белка (степень очистки 250 раз). На основе полученных данных разработан лабораторный регламент получения L-лизин- α -оксидазы.

Впервые показано, что ЛО синтезируется грибами рода *Trichoderma* при росте на субстратах из семян различных злаковых культур. Процесс биосинтеза ЛО грибом *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D сопровождается накоплением в ростовой среде не только внеклеточных протеолитических ферментов, гидролизующих белковые компоненты пшеничных отрубей и обеспечивающих поступление в среду роста аминокислот, а также H_2O_2 и пипеколиновой кислоты – элиситоров системной устойчивости растений.

Показано, что ЛО является высокоактивным стереоспецифичным ферментом с широким рН оптимумом (рН 4,0-8,9), стабильным при хранении, устойчивым к действию детергентов, мочевины, протеаз и температуры. Изучение кинетических характеристик, проведенное с учетом аллостерических эффектов ($h = 2,03$), позволило выявить высокое сродство ЛО к лизину ($K_m \approx 10^{-5}$ М). Указанные характеристики ЛО из *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D демонстрируют высокий потенциал фермента в окружающей среде.

Установленные антимикробные и ферментативные свойства, а также образование пипеколиновой кислоты и H_2O_2 в микроокружении гриба определяют функциональную роль внеклеточной ЛО. С одной стороны, ЛО выполняет защитные функции для продуцента и обеспечивает ему адаптивное преимущество в конкуренции с другими организмами. С другой стороны, ЛО может опосредованно участвовать в индуцировании системной устойчивости растений и регулировании взаимоотношений “*Trichoderma* – растение – патоген”. В эволюционном аспекте системная устойчивость базируется на нескольких стратегиях, которые значительно различаются от вида к виду. Маловероятно, что существует единый ключ регуляции, ЛО – лишь один из механизмов.

Указанная биологическая активность наряду с физико-химическими свойствами, включая кинетические характеристики, позволяют рассматривать ЛО в качестве перспективного

противоопухолевого средства в терапии онкологических заболеваний. Полученные по разработанной схеме стандартные образцы гомогенного фермента из *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D проходят испытания в ГОУ РОНЦ.

Рассматривая перспективы использования ЛО в других областях, следует указать возможное использование фермента для создания биосенсоров, а также для разработки лекарственных средств против бактерий, резистентных к антибиотикам.

ВЫВОДЫ

1. В результате скрининга найден активный штамм-продуцент ЛО, выделенный из образцов лесной почвы (г. Пушкино, Московская область), идентифицированный как *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D.
2. Впервые показано, что синтез ЛО происходит в процессе роста грибов рода *Trichoderma* на субстратах из семян различных злаковых растений.
3. Подобраны оптимальные условия биосинтеза ЛО: тип культивирования (погруженное), субстрат (пшеничные отруби), pH ($\leq 6,0$), pO_2 (70 – 80%), температурный режим (37 °C → 1 – 5 сут), 24 °C → 6 – 12 сут роста).
4. Предложены 2 высокоэффективных метода выделения ЛО:
А) отработан метод, основанный на осаждении $(NH_4)_2SO_4$ с последующими гидрофобной и ионообменной хроматографиями.
Б) разработан новый метод, основанный на осаждении фермента комплексными солями Cu^{2+} , также с последующей гидрофобной и ионообменной хроматографией.
Получен гомогенный препарат с высокой удельной активностью (100 Е/мг белка), позволяющий его использование в медицинских исследованиях.
5. Определены ферментативные свойства ЛО:
- Установлены молекулярная масса ЛО, количество и масса субъединиц, кофермент (ФАД), оптимумы pH и температуры.
- Впервые определены кинетические характеристики фермента с учетом аллостерических эффектов: оценены коэффициент Хилла ($h = 2,03 \pm 0,14$) и K_m ($1,015 \cdot 10^{-5}$ М). Показаны высокие селективность и стереоспецифичность.
- Впервые определена термодинамическая характеристика ЛО - энергия активации (2,61 ккал/моль).
- Показана высокая стабильность фермента: устойчивость при хранении, к действию детергентов (ДСН), мочевины, протеаз и температуры.
6. Впервые выявлены факторы, предопределяющие функциональную роль ЛО: показано, что процесс синтеза ЛО грибом *Trichoderma* сопровождается накоплением в ростовой среде пипеколиновой кислоты и H_2O_2 - элиситоров системной устойчивости растений.
7. Впервые определен механизм антимикробного действия фермента ЛО как фактора конкуренции гриба *Trichoderma* с грамотрицательными и грамположительными бактериями, а также фитопатогенными грибами. Показано, что действие ЛО обусловлено образованием экзогенного пероксида водорода, а также внутриклеточных АФК.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи:

1. **Макрушин К.В.** Поиск продуцентов L-лизин-α-оксидазы среди грибов рода *Trichoderma* / **К.В. Макрушин**, А.Ю. Аринбасарова, Н.И. Чигинёва, Е.В. Лукашёва, А.Г. Меденцев, Т.Т. Березов // Биотехнология. – 2011. – № 5. – С 44-49. Импакт-фактор РИНЦ 1,636
2. Аринбасарова А.Ю. Образование внеклеточных H₂O₂ и L-лизин-α -оксидазы в процессе глубинного роста гриба *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D при солевом стрессе / А.Ю. Аринбасарова, **К.В. Макрушин**, А.Г. Меденцев, Е.В. Лукашева, Т.Т. Березов // Микробиология. – 2012. – Т. 81. – № 6. – С. 741-744. Импакт-фактор РИНЦ 1,45
3. **Makrushin K.V.** Isolation, purification and some properties of L-lysine α-oxidase from *Trichoderma* sp. 6 / **K.V. Makrushin**, A.G. Medentzev, A.Y. Arinbasarova, E.V. Lukasheva, T.T. Berezov // Biochemistry and Biotechnology: Research and Development. Nova Science Publishers, Inc. – 2012. – С. 7-15.
4. **Макрушин К.В.** Синтез L-лизин-α-оксидазы грибами *Trichoderma* в условиях глубинного культивирования / **К.В. Макрушин**, А.Ю. Аринбасарова, Е.В. Лукашева, А.Г. Меденцев, Т.Т. Березов // Биотехнология. – 2012. – № 4. – С. 39-44. Импакт-фактор РИНЦ 1,636
5. Аринбасарова А.Ю. Выделение и свойства L-лизин- α-оксидазы из гриба *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D / А.Ю. Аринбасарова, В.В. Ашин, **К.В. Макрушин**, А.Г. Меденцев, Е.В. Лукашева, Т.Т. Березов // Микробиология. – 2012. – Т. 81. – № 5. – С. 594-599. Импакт-фактор РИНЦ 1,45

Тезисы:

1. Лукашева Е.В., Жукова О.С., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г., **Макрушин К.В.**, Трещалина Е.М., Барышников А.Ю., Березов Т.Т. Получение конъюгатов L-лизин-α -оксидазы с антителами и изучение их цитотоксичности. Материалы конференции Российского биотерапевтического журнала. Москва 2009, Т. 8, № 3, С. 80.
2. **Макрушин К.В.** Биосинтез L-лизин-α-оксидазы грибами рода *Trichoderma* / **К.В. Макрушин**, А.Ю. Аринбасарова, Е.В. Лукашева, А.Г. Меденцев, Т.Т. Березов // Тезисы докладов V Московского международного конгресса «БИОТЕХНОЛОГИЯ: состояние и перспективы развития». Москва, 2009. – С. 44.
3. **Макрушин К.В.** Регуляция синтеза L-лизин-альфа-оксидазы грибом *Trichoderma* sp / **К.В. Макрушин**, А.Ю. Аринбасарова, Е.В. Лукашева, А.Г. Меденцев // Биология - наука XXI века: тезисы 14-й Пущинской школы конференции молодых ученых. Пущино, 2010. – Т. 1. – С. 263.
4. **Макрушин К.В.** Выделение, очистка и некоторые свойства L-лизин-α-оксидазы из *Trichoderma* sp. 6 / **К.В. Макрушин**, А.Ю. Аринбасарова, В.И. Крупянко, Е.В. Лукашева, А.Г. Меденцев // Тезисы докладов VI Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 2011. – Т. 1. – С. 117.
5. **Макрушин К.В.** Внеклеточная L-лизин-α-оксидаза гриба *Trichoderma* cf. *aureoviride* rifai ВКМ F-4268D и развитие системной устойчивости растений / **К.В. Макрушин**, А.Г. Меденцев, Е.В. Лукашева, А.Ю. Аринбасарова // Тезисы докладов IX Московского международного конгресса «БИОТЕХНОЛОГИЯ: состояние и перспективы развития» Москва, 2017. – Т. 2. – С. 75-77.
6. **Макрушин К. В.** Зачем грибы *Trichoderma* синтезируют внеклеточную L-лизин-α-оксидазу / **К.В. Макрушин**, Б.П. Баскунов, А.Ю. Аринбасарова, А.Г. Меденцев // Тезисы IV Пущинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». Пущино, 2017. – С. 79-80.
7. Аринбасарова А.Ю. Физиолого-биохимические аспекты синтеза L-лизин-α-оксидазы грибом *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D / А.Ю. Аринбасарова, **К.В. Макрушин**, Е.В. Лукашева, А.Г. Меденцев // Современная микология в России. Материалы 4-го Съезда микологов России. Москва, 2017. – Т. 7. – № 9. – С. 297-298.