

I. V. Zhernosekova, A. I. Vinnikov

Optimization of enzyme medium for rifampicin resistant mutants of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* using mathematical planning of experiments

УДК 579.873.71+577.15

І. В. Жерносекова, А. І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет

**ОПТИМІЗАЦІЯ ФЕРМЕНТАЦІЙНОГО СЕРЕДОВИЩА
ДЛЯ РИФАМПЦИНОСТІЙКИХ МУТАНТІВ *STREPTOMYCES*
RECIFENSIS VAR. *LYTICUS* ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДУ
МАТЕМАТИЧНОГО ПЛАНУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТІВ**

Оптимізовано співвідношення десяти компонентів, які входять до складу ферментаційного середовища для стрептоміцетів з використанням симплексного методу. Це підвищило рівень активності літичних ферментів як у вихідного штаму П-29, так і в рифампіциностійких мутантів у 4–9 разів.

Ten components of the fermentative media have been optimized for the *Streptomyces* by a method of simplex. The level of activity of the lytic enzymes was increased in both the initial strain P-29 and the rifampycin-resistant mutants 4–9 times.

Вступ

Відомо, що склад ферментаційного середовища та кількісні співвідношення живильних речовин у ньому мають велике значення для біосинтезу біологічно-активних речовин як “диких”, так і селекціонованих штамів.

Раніше повідомлялось, що штам *S. recifensis* var. *lyticus* 2435 здатний синтезувати комплекс літичних ферментів, який лізує не тільки вбиті, а й живі клітини стафілокока, при заміні специфічних індукторів композицією іонів металів

© І. В. Жерносекова, А. І. Вінніков, 2006

67

[8]. Розроблене ферментаційне середовище було оптимізоване за кількісним вмістом компонентів у ньому [5]. На оптимізованому середовищі (ФС-1) стафілолітична активність штаму 2435 досягла рівня 2500 од./мл, що сумарно перевищило його вихідну активність майже в 30 разів.

За результатами трьохступеневої селекції з використанням протопластування [4] та селективної дії рифампіцину відібрана колекція Rif^r -мутантів [2]. Виявилось, що ферментаційне середовище (ФС-1), розроблене для батьківського штаму 2435, непридатне для реалізації високої активності відібраних мутантів. Їх активність на цьому середовищі характеризувалась рівнем 300–600 од./мл, проте при підвищенні концентрації глюкози вона досягала 1800–2000 од./мл [3]. Ці дані вказували на необхідність проведення додаткових досліджень з оптимізації кількісного вмісту живильних речовин у вихідному середовищі ФС-1. Для вирішення цього завдання використано один із простих методів математичного планування експериментів.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт досліджень – Rif^r -мутанти, відібрані як найбільш перспективні варіанти при використанні рифампіцину на двох ступенях селекції продуцента літичних ферментів *S. recifensis* var. *lyticus*.

За основу взяте ферментаційне середовище (ФС-1), оптимізоване для батьківського штаму 2435. До його складу входять 10 компонентів у таких співвідношеннях (г/л): соєве борошно – 4,75; NH_4NO_3 – 0,75; глюкоза – 0,7; K_2HPO_4 – 0,16; $CaCO_3$ – 2,3; $CaCl_2$ – 1,56; $MgCl_2$ – 0,69; $MnCl_2$ – $1,3 \cdot 10^{-2}$; $FeSO_4$ – $7,6 \cdot 10^{-2}$; $ZnSO_4$ – $1,9 \cdot 10^{-4}$. Оптимізацію проводили за симплексним методом математичного планування експериментів [1].

В основу цього методу покладено не гіперкуб, а просту геометричну фігуру при заданому числі факторів. Принцип симплексного планування полягає в тому, що умови першої серії дослідів у багатовимірному просторі відповідають координатам крапок у n -мірному просторі. Після проведення першої серії дослідів виявляється варіант середовища, що дав найгірший результат. Ця крапка замінюється новим варіантом середовища, що являє собою дзеркальне відображення щодо протилежної грані отриманої фігури. Процедура крокового підвищення з послідовним відкиданням найгірших крапок (варіантів середовища) повторюється доти, поки не досягається стаціонарна область.

У зв'язку з тим, що координати вихідного симплексу розраховані на сім факторів [1], а до ферментаційного середовища входять 10 компонентів, його оптимізацію проводили в два етапи. На першому етапі варіювали чотири фактори (соєве борошно, NH_4NO_3 , глюкоза та K_2HPO_4) при постійному вмісті мікро- і макроелементів. У цих дослідях контролем було вихідне середовище (ФС-1). На другому етапі варіювали макро- і мікроелементи (шість факторів). У цих дослідях як контроль використовували ферментаційне середовище, оптимізоване за основними джерелами живлення.

Досліди проводили у трьох повторах за планом, складеним відповідно до симплексного методу. Для реалізації вихідного плану експериментів нами з рифампіциностійких мутантів відібрано два варіанти 1Р-40 і 1Р-116, які висівались на розраховані варіанти середовищ (на першому етапі – 5, на другому – 7). Культури вирощували в глибинних умовах (220 обертів/хвилину) при $+29^\circ C$ протягом 72 годин. Про активність штамів на відповідних варіантах середовища судили за рівнем стафілолітичної активності, яку визначали за методом Isono et al. [9] і виражали в од./мл. Реакційну суміш, яка містить 1 мл ферментного розчину та 1 мл суспензії клітин *Staphylococcus aureus* 209 P (вихідна оптична щільність при λ 590 нм в 0,5 см кварцовій кюветі складала 0,5–0,6) інкубували при $+55^\circ C$ протягом 30 хвилин. За одиницю активності приймали таку кількість ферменту, яка знижувала

оптичну щільність суспензії на 0,001 за 1 хвилину при розведенні ферменту, здатному сприяти лізусу клітин на 25–30 %. Отриманий новий варіант ферментаційного середовища (ФС-2) використовували для вирощування та оцінки літичної активності рифампіциностійких мутантів, відібраних у процесі селекції продуцента літичних ферментів *S. recifensis* var. *lyticus* [2].

Результати та їх обговорення

У табл. 1 наведено склад п'яти варіантів ферментаційного середовища, розрахованих для чотирьох факторів живлення.

Таблиця 1

Склад різних варіантів ферментаційного середовища, розрахованих за координатами вихідного симплексу для чотирьох факторів ($R = 4+1$)

Варіант середовища	Концентрація живильних речовин у середовищі, %			
	X_1 – соя	X_2 – NH_4NO_3	X_3 – глюкоза	X_4 – K_2HPO_4
1	0,55	0,11	0,51	0,03
2	0,45	0,11	0,51	0,03
3	0,50	0,07	0,51	0,03
4	0,50	0,10	0,35	0,03
5	0,50	0,10	0,50	0,02
ФС-1(К)	0,475	0,075	0,07	0,016

Слід відзначити, що при оптимізації ферментаційного середовища важливий вибір нульових рівнів факторів та інтервалів їх варіювання. Враховуючи отримані нами дані про зниження чутливості *Rif^r*-мутантів до інгібуючої дії глюкози [3], вихідним рівнем її вмісту було прийнято концентрацію 0,50 замість 0,07 %, яку має ферментаційне середовище ФС-1 (табл. 1).

На першому етапі оптимізації вихідного середовища за чотирма факторами (соєве борошно, NH_4NO_3 , глюкоза та K_2HPO_4) на всіх п'ятьох варіантах середовищ при вирощуванні двох рифампіциностійких мутантів отримано значне зростання стафілолітичної активності (табл. 2). Так, у штаму 1P-40 вона перевищувала контроль у 4,6–7,4 раза, а у штаму 1P-116 – у 5,4–9,4 раза.

Таблиця 2

Вплив зміни концентрації основних джерел живлення (N , C , P) у вихідному ферментаційному середовищі (ФС-1) на стафілолітичну активність двох *Rif^r*-мутантів

<i>Rif^r</i> -мутант	Номер варіанта середовища	Літична активність, од./мл	Коефіцієнт розбіжності	Ступінь оптимізації	Літична активність, од./мл	Коефіцієнт розбіжності
1P-40	1	2080±42,0	7,4	–	–	–
	2	1800±57,7	6,4	–	–	–
	3	1730±76,8	6,1	III	2210±103,0	7,8
	4	1300±28,9	4,6	I	3150±86,6	11,1
	5	1420±95,3	5,0	II	1350±28,9	4,8
	ФС-1(К)	280±28,9	1,0	ФС-1(К)	280±28,9	1,0
1P-116	1	2080±42,0	8,9	–	–	–
	2	1550±86,6	6,6	II	2000±57,7	8,6
	3	1600±57,7	6,9	III	1900±51,0	8,1
	4	1250±28,9	5,4	I	3000±115,0	12,9
	5	2200±38,4	9,4	–	–	–
	ФС-1(К)	233±19,0	1,0	ФС-1(К)	233±19,0	1,0

Після реалізації першої серії дослідів для обох досліджуваних штамів гіршим варіантом середовища, на якому була отримана найнижча активність, виявився варіант № 4. Звертає на себе увагу те, що низька активність на цьому середовищі

обумовлена найнижчим вмістом у ньому глюкози (див. табл. 1). Математично розраховано склад нового середовища, до якого входило: соєве борошно – 0,5 %, NH_4NO_3 – 0,095 %, глюкоза – 0,66 %, K_2HPO_4 – 0,025 %. Цей варіант введено у вихідний симплекс чотирьох факторів замість виключеного варіанта № 4. Процедура крокового підвищення з послідовним відкиданням найгірших варіантів ми повторили тричі. Як видно з табл. 2, фактично нам треба було провести тільки один ступінь оптимізації з заміною найгіршого варіанта (№ 4) новим, щоб досягти стаціонарної області. При проведенні ферментації на цьому варіанті середовища стафілолітична активність штамів досягала 3000–3150 од./мл замість 1250–1300 од./мл, виявлених на виключеному варіанті.

Другий етап оптимізації ферментаційного середовища за мікро- і макроелементним складом проводили аналогічним чином, але на фоні поліпшеного складу вихідного середовища, тобто на оптимізованому за основними джерелами живлення. У табл. 3 наведені дані про фактори, що варіюються. План експериментів складався з 7 варіантів середовища з варіюванням концентрацій 6 факторів.

Таблиця 3

**Склад різних варіантів ферментаційного середовища
за вмістом макро- і мікроелементів, розрахований відповідно до координат
вихідного симплексу для $R = 6+1$ (другий етап оптимізації)**

Номер варіанта середовища	Концентрація мінеральних сполук у середовищі, %					
	$X_1 - FeSO_4$	$X_2 - CaCO_3$	$X_3 - CaCl_2$	$X_4 - MgCl_2$	$X_5 - ZnSO_4$	$X_6 - MnCl_2$
1	0,009	0,28	0,20	0,056	$0,2 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$
2	0,005	0,28	0,20	0,056	$0,2 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$
3	0,007	0,16	0,20	0,056	$0,2 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$
4	0,007	0,25	0,14	0,056	$0,2 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$
5	0,007	0,25	0,19	0,018	$0,2 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$
6	0,007	0,25	0,19	0,050	$0,11 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$
7	0,007	0,25	0,19	0,050	$0,19 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$
ФС-1* (контроль)	0,0076	0,23	0,156	0,069	$0,19 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$

Примітки: * оптимізоване середовище за основними джерелами живлення (N, C, P).

Результати проведених дослідів свідчать про те, що зміна співвідношень іонів мінерального живлення у більшості варіантів середовищ не впливає істотно на літичну активність штаму 1P-40, яка коливалася в межах 83–108 % до контролю (табл. 4).

Таблиця 4

**Стафілолітична активність рифампіциностійкого мутанта 1P-40 у процесі оптимізації
макро- та мікроелементного складу ферментаційного середовища (другий етап оптимізації)**

Номер варіанта середовища	Літична активність		Ступінь оптимізації	Літична активність	
	од./мл	% до К		од./мл	% до К
1	2410±69,5	101	–	–	–
2	3060±115	128	–	–	–
3	2600±28,9	108	–	–	–
4	2390±34,6	97	III	1660±115	97
5	2250±46,2	94	II	2060±66,8	120
6	2460±78,0	103	–	–	–
7	2000±75,0	83	I	2080±46,2	121
Контроль*	2400±57,7	100	контроль*	1720±94,2	100

Примітки: * середовище ФС-1, оптимізоване за основними джерелами живлення.

На одному середовищі (варіант № 2) вона перевищувала контроль на 28 %. При заміні гірших варіантів (№ 7, 5 та 4) новими активність зростала, однак вона за-

лишалася нижчою порівняно з варіантом № 2. Цей варіант середовища (ФС-2) використано нами для оцінки стафілолітичної активності, виділеної в процесі селекції колекції рифампіциностійких мутантів. Як видно з табл. 5, літична активність вихідного штаму П-29 на цьому середовищі досягла 2000 од./мл, а кращих рифампіциностійких мутантів, відібраних на двох ступенях селекції, коливалася в межах від 3000 до 6300 од./мл.

Таблиця 5

Стафілолітична активність рифампіциностійких варіантів штаму П-29, відібраних на двох ступенях селекції (глибинна ферментація)

Номер варіанта	I ступінь		Номер варіанта	I ступінь		Номер варіанта	II ступінь	
	од./мл	% до К		од./мл	% до К		од./мл	% до К
П-29 (К)	2000	100	П-29 (К)	2000	100	1P-92 (К)	4200	100
1P-40	3000	150	1P-160	3730	186	2P-14	5110	122
1P-83	3270	163	1P-165	3270	163	2P-15	6300	150
1P-87	3500	175	1P-179	3270	163	2P-18	5500	131
1P-92	4000	200	1P-190	3500	175	2P-19	5500	131
1P-116	3000	150	1P-199	3500	175	2P-20	5130	121
1P-142	3270	163	1P-232	4200	210	2P-21	5130	121

Відомо, що штами, нечутливі до катаболітної репресії, відрізняються високою активністю синтезу позаклітинних ферментів на середовищах із підвищеним вмістом глюкози [7]. Раніше повідомлялось, що відібрані нами *Rif^r*-мутанти даного продуцента характеризуються зниженням чутливості до інгібуючої дії глюкози [3]. Оптимізація ферментаційного середовища під контролем стафілолітичної активності забезпечила спрямоване збільшення синтезу тієї частини індивідуальних ферментів комплексу, яка має велике значення для гідролізу пептидоглікану стафілокока. У роботі [6] при селекції того ж продуцента під контролем лізису клітин *Lactobacillus delbrueckii* відібрані варіанти, які перевищують вихідний штам за активністю лізису цих бактерій у 2,0–2,5 раза.

Висновки

Застосування симплексного методу планування експериментів дозволило нам при мінімальних затратах (на двох ступенях було використано 8+10 варіантів середовища) оптимізувати співвідношення десяти компонентів живлення, які входять до складу вихідного ферментаційного середовища. У новому варіанті середовища ФС-2 зросла концентрація NH_4NO_3 , K_2HPO_4 , $CaCO_3$, $CaCl_2$ у 1,2–1,6 раза й суттєво (у 9,4 раза) збільшено вміст глюкози (з 0,07 до 0,66 %).

Бібліографічні посилання

1. Горский В. Г. Симплексный метод планирования экспериментов / В. Г. Горский, В. З. Бродский // Заводская лаборатория. – 1965. – № 7. – С. 831–836.
2. Жерносекова И. В. Изменчивость продуцента литических ферментов *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* и его селекция. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – К., 2002. – 20 с.
3. Жерносекова И. В. Влияние глюкозы на биосинтез экстрацеллюлярных ферментов *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 и его мутантами / И. В. Жерносекова, Т. П. Килочек // Микробиол. журн. – 2000. – Т. 62, № 2. – С. 19–26.
4. Использование методов протопластирования в селекции продуцента литических ферментов *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* / Т. Я. Куликова, А. С. Стенько, Н. К. Безкорвайная, Ю. С. Бабенко // Антибиотики и химиотер. – 1994. – Т. 39, № 2/3. – С. 9–12.
5. Килочек Т. П. Оптимизация питательной среды для биосинтеза литических ферментов штаммом *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 / Т. П. Килочек, Ю. С. Бабенко // Микробиол. журн. – 1995. – Т. 57, № 4. – С. 12–17.

6. **Одержання мутантів *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*** зі зміненою бактеріолітичною активністю / Т. С. Тодосійчук, Л. М. Шинкаренко, В. О. Федоренко, Л. І. Басілія // Мікробіол. журн. – 1998. – Т. 60, № 4. – С. 49–56.
7. **Прист Ф.** Внеклеточные ферменты микроорганизмов. – М.: Мир, 1987. – 117 с.
8. **Шинкаренко Л. Н.** Литические ферменты *Actinomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 и условия, влияющие на их биосинтез. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1979. – 16 с.
9. **Isono M.** Bacteriolytic enzyme and process for the production there of. Pat. 3649454 USA, C 12 K 1/06. / M. Isono, T. Takahashi, Y. Yamadzaki. – Publ. 10.04.72.

Надійшла до редколегії 01.02.06.

УДК 577.115 + 633.11 + 632.154

Л. Ф. Заморуєва, І. О. Філонік

Дніпропетровський національний університет

КОМПЛЕКСНИЙ ВПЛИВ ГЕРБІЦИДУ ДІАЛЕНУ С ТА КАДМІЮ НА СКЛАД ЛІПІДІВ І ВІЛЬНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ ПРИ ПРОРОСТАННІ НАСІННЯ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Вивчено вплив післясходового комбінованого гербіциду діалену С, кадмію та їх спільної дії на фізіолого-біохімічні показники ліпідного обміну в зерні озимої пшениці при проростанні. Виявлено редукцію вмісту загальних ліпідів, активності ліпаз, фракцій стеринів та вільних жирних кислот у зерні під впливом токсикантів. Охарактеризовано зміни компонентного складу вільних жирних кислот, які можуть бути використані як індикатори дії екзогенних факторів.

The influence of combine herbicide Dialen S, cadmium and their complex action on the indices of lipid exchange in the seeds of winter wheat during the germination were studied. The reduction of whole lipid content, lipase activity, sterols and free fatty acids in the grain under the toxicant action were revealed. Alteration of the free fatty acid composition can be used as a marker of the exogenic factors action.

Вступ

Розвиток промислового виробництва, збільшення викидів автомобільного транспорту, інтенсивне використання хімічних засобів у сільському господарстві викликають зростання комплексного забруднення ґрунтів важкими металами та іншими токсикантами. Це шкідливо відбивається на сільськогосподарських культурах, що вирощуються з інтенсивним використанням пестицидів, мінеральних добрив, інших засобів захисту та прискорення розвитку рослин. Дію всіх хімічних сполук і сумішей на культурні рослини необхідно глибоко досліджувати з метою підвищення врожайності зернових та одержання екологічно чистої кінцевої продукції високої якості. Тому вивчення комплексної дії антропогенних факторів на ліпіди та їх обмін у зерні озимої пшениці при проростанні актуальне, оскільки дозволить виявити негативний вплив факторів довкілля на фізіолого-біохімічні процеси у злакової культури, яка в польових умовах вирощується в умовах комплексного забруднення ґрунтів.

Комплексна дія гербіциду та важкого металу кадмію у більшості негативно впливала на ріст і розвиток паростків озимої пшениці, викликаючи гальмування темпів їх росту, особливо при вищих концентраціях токсикантів. Ліпіди та жири в цілому відіграють важливу роль у розвитку живих організмів і в рослинних – також, оскільки є захисними речовинами, які забезпечують енергетичний потенціал зерна при проростанні. Крім цього, вони мають також захисну функцію як важливі компоненти біологічних мембран [6]. Тому вивчення впливу антропогенних факторів

© Л. Ф. Заморуєва, І. О. Філонік, 2006