

УДК 579.8.+577.152.3.

Т. П. Кілочок, І. Є. Соколова, Н. П. Чорногор,
О. А. Тимчук, І. В. Жерносекова
Дніпропетровський національний університет

ВПЛИВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА БІОСИНТЕЗ, АКТИВНІСТЬ ЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ І РОСТОСТИМУЛЮЮЧОГО ФАКТОРА У *STREPTOMYCES RECIFENSIS* VAR. *LYTICUS* П-29

Вивчали вплив важких металів на ріст, біосинтетичну активність, прояв літичної дії та ростостимулюючу активність компонентів ферментного комплексу *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*. Було виявлено, що солі свинцю позитивно впливають як на біосинтез гідролітичних ензимів – літичних ендопептидаз, протеїназ, амілаз, а також підвищують ростостимулюючу активність по відношенню до дріжджів.

Influence of heavy metals on growth, biosynthesis, lytic action and growthstimulating activity enzymes complex of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* was studied. It was showed that salt of plumbum has positive influence as on biosynthesis hydrolases (lytic endopeptidases, proteinases, amylases) as well increase growthstimulating activity of preparation relatively the yeast.

З літератури відомо, що літичні ферменти мікробного походження відносяться до індукцибельних, тобто їх синтез залежить від умов культивування (рН-середовища, аерації, температури та складу живильного середовища). Раніше встановлено, що штам *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* є синтезатором складного комплексу бактеріолізинів та стимулятором росту на середовищі, до складу якого входять соєве борошно, глюкоза, NH_4NO_3 , K_2HPO_4 та композиція йонів металів, які, як відомо, виступають в якості індукторів синтезу бактеріолізинів. Для створення промислових технологій актуальним є пошук оригінальних продуцентів ензимів, отримання високоактивних штамів, розробка та оптимізація живильних середовищ, а також вивчення закономірностей та механізмів регуляції біосинтезу ферментів залежно від умов культивування. Метою даної роботи було дослідити вплив деяких важких металів на біосинтетичну здібність штаму, активність ензимів та ростостимулюючий фактор.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був штам *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* [5]. Культивування проводили протягом 48–72 год при 28°C на ферментаційному середовищі наступного складу (%): соєве борошно – 0,475; глюкоза – 0,07; NH_4NO_3 – 0,075; K_2HPO_4 – 0,016; CaCO_3 – 0,23; CaCl_2 – 0,156; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,069; $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $0,13 \cdot 10^{-2}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – $0,76 \cdot 10^{-2}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $0,19 \cdot 10^{-4}$. Об'єм колб – 750 мл, робочий об'єм – 100 мл, швидкість обертання – 220 об/хв. Про біосинтетичну активність продуцента судили за рівнем бактеріолітичної, протеолітичної, амілолітичної дії та здібності інактивованого при кип'ятінні препарату стимулювати ріст дріжджів *Candida guilliermondii*.

Літичну активність визначали турбідиметричним методом. За одиницю активності приймали таку кількість ферменту, що знижувала оптичну щільність суспензії на 0,001 за 1 хв [6]. В якості субстрата (тест-культур) бактеріолітичних ферментів використовували відмиті інтактні клітини *Staphylococcus aureus* 209P, *Micrococcus lysodeikticus*.

Білок визначали за методом Lowry, або спектрофотометричним методом.

© Кілочок Т. П., Соколова І. Є., Чорногор Н. П., Тимчук О. А., Жерносекова І. В., 2005

Протеолітичну активність визначали за методом Ансона в модифікації Авіженіса і Савіцкайте [1].

Амілолітичну активність визначали за здібністю ферменту α -амілази гідролізувати крохмаль [2].

Ферментні препарати отримували з культуральної рідини, звільненої від міцелію центрифугуванням. Для виділення та фракціонування ферментів використовували такі методи, як осаджування білків ацетоном, висолювання сірчаною кислотою та гельфільтрацію на сефадексі G-75 (Pharmacia, Швеція).

Ростостимулюючу дію препарату визначали за його здібністю (після термоінактивації ензимів кип'ятінням протягом 15 хвилин) збільшувати накопичення біомаси тест-культури – *C. guilliermondii* на МПБ з глюкозою (2%).

Результати та їх обговорення

Для з'ясування впливу важких металів на біосинтез ферментів проводили дві серії експериментів. У першому випадку різні концентрації металів вносили при культивуванні стрептоміцету на твердому середовищі. В другому – метал вносився безпосередньо в рідке ферментаційне середовище культивування. В якості контролю було взяте оптимізоване середовище без додавання металів. Після проведення ферментації визначали накопичення біомаси, а також різні ферментативні активності. Результати досліджень приведені у табл. 1.

Враховуючи, що метали можуть чинити різний вплив на біосинтез окремих ферментів комплексу, літичну активність визначали по відношенню до двох тест-культур *S. aureus* та *M. lysodeikticus*, які відрізняються будовою клітинної стінки. В лізисі стафілокока переважну роль відіграють літичні ендопептидази, в лізисі мікрокока – літичні глікозидази, зокрема лізоцим.

Як видно з табл.1, літична активність ферментів по відношенню до обох тест-культур значно знижується при внесенні металів у рідке ферментаційне середовище, причому найбільш чутливими до токсичної дії важких металів є, очевидно, глікозидази. Про це свідчить значне зниження літичної активності у відношенні мікрокока. При додаванні йонів металів до твердого середовища були виявлені інші закономірності. Так, виражений стимулюючий ефект йонів свинцю (0,003 мг/мл) був виявлений по відношенню до біосинтезу ферментів, які розчинюють клітини *M. lysodeikticus*, а йони цинку стимулювали синтез стафілолітичних ензимів. Щодо впливу металів на ростові процеси, то максимальне накопичення біомаси продуцента спостерігалось при внесенні до твердого середовища йонів Pb^{2+} (у 1,5 раза), що корелювало з підвищенням літичної активності у відношенні мікрокока. Збільшені показники виходу біомаси були виявлені також при внесенні у тверде середовище й інших металів. Культивування продуцента в рідкому середовищі з додаванням йонів металів суттєво не відбивалося на накопиченні біомаси, за винятком дослідів з внесенням барію, який декілька підвищував цей показник.

Як видно з табл. 1, внесення в поживні середовища досліджуємих йонів металів по-різному впливає на здібності штаму до синтезу інших гідролаз. Так, протеолітична активність була повністю відсутня або значно знижена при внесенні як у тверде, так і в рідке середовища $HgCl_2$, $CdSO_4$, $ZnSO_4$, за винятком свинцю, який підвищував активність протеїназ у 1,5–1,6 раза (0,003 мг/мл), та барію, що незначно збільшував протеолітичну активність при додаванні в тверде середовище (0,005 мг/мл). Подібні результати щодо стимулюючої дії свинцю і барію були отримані при вивченні амілолітичної активності. Цей показник під впливом свинцю

при оптимальних концентраціях у рідкому та твердому середовищах збільшився відповідно у 2 та 3,2 раза, при додаванні барію в тверде середовище – у 1,5 раза. Також слід відзначити, що інгібуючий вплив на синтез даних ферментів проявляють йони цинку, які при внесенні в рідке середовище повністю пригнічують активність протеїназ та амілаз. Виняток складає Zn^{2+} у концентрації 0,001 мг/мл, який значно підвищує активність амілаз при внесенні в тверде середовище культивування.

Таблиця 1

Вплив металів на біосинтетичну спроможність штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*

Додавання металів до твердого середовища						
доданий елемент	концентрація мг/мл	біомаса, мг/мл	літична активність, од/мл±m		протеолітична активність, % до К	амілолітична активність, % до К
			<i>S. aureus</i>	<i>M. lysodeikticus</i>		
Контроль	–	6,4	2500 ± 10	5 500 ± 16	100	100
BaCl ₂	0,005	6,6	2 000 ± 40	5 333 ± 33	111	153
	0,05	8,7	1 700 ± 30	4 000 ± 33	6	74
ZnSO ₄	0,001	6,4	2 830 ± 75	4 333 ± 33	1,1	297
	0,003	4,5	2 700 ± 60	4 166 ± 16	3	47
Pb(NO ₃) ₂	0,001	9,3	2 100 ± 24	5 000 ± 16	118	97
	0,003	10,0	2 500 ± 50	6 500 ± 30	151	322
Додавання металів при вирощуванні штаму в рідкому середовищі						
BaCl ₂	0,005	6,0	1 166 ± 46	1 600 ± 06	0	19
	0,05	8,6	1 100 ± 06	1 500 ± 21	13	101
ZnSO ₄	0,001	4,6	1 100 ± 15	1 333 ± 16	0	0
	0,003	5,8	1 400 ± 10	1 166 ± 15	14,8	0
Pb(NO ₃) ₂	0,001	6,2	1 000 ± 16	1 100 ± 23	0	148
	0,003	7,3	1 500 ± 16	2 000 ± 33	159	202
HgCl ₂	0,0005	5,5	1 166 ± 32	1 000 ± 11	0	54
	0,001	4,6	1 333 ± 34	1 166 ± 27	0	0
CdSO ₄	0,0005	6,5	1 000 ± 34	1 333 ± 24	0	32
	0,001	4,6	1 000 ± 25	1 000 ± 18	0	63

Узагальнюючи отримані дані, слід відзначити, що йони Ba²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺ мають важливе значення для формування ферментів, що лізують клітини *Staphylococcus aureus* й *Micrococcus lysodeikticus*. Особливо велику роль відіграють йони свинцю, які забезпечують високий синтез практично всіх груп ферментів складного комплексу. З цим, напевно, пов'язаний і високий вміст білка в даній культуральній рідині. Слід відмітити, що досліджуваний штам-продуцент був виділений з ґрунтів Дніпропетровської області, де зареєстровані підвищені концентрації важких металів. Це може пояснювати стійкість даного штаму до їх токсичної дії.

З метою вивчення впливу свинцю на кількісний та якісний склад ферментного комплексу було отримано 3 ацетонових препарати. Для цього стрептоміцет вирощували без додавання металу (контрольний варіант), з додаванням свинцю (0,003 мг/мл) у тверде середовище з наступним глибинним культивуванням (аналіз адаптаційних можливостей продуцента), а також з внесенням металу безпосередньо у рідке середовище (визначення впливу на біосинтез ензимів). Культуральну рідину по закінченні ферментації звільняли від міцелію та змішували з охолодженим

ацетоном (1:2). Отримані після центрифугування осад розчиняли у 0,05М ацетатному буфері (рН 5,4) та фракціонували на колонці з сефадексом G-100.

Як показали результати фракціонування, при додаванні важких металів у тверде та рідке середовища основний білковий пік утворюється у початкових фракціях (6–10), як і в контрольному зразку. Білки цих фракцій складають приблизно 70% від загальної кількості елюйованого білка. Білкові профілі мають подібну картину для всіх трьох препаратів, але вміст білка в препаратах, отриманих при додаванні свинцю, в обох випадках перевищує вміст його у контролі. Основна маса літичних ензимів зосереджена у фракціях з низькими концентраціями білка, причому всі три препарати найбільшу літичну активність проявляли по відношенню до клітин мікрокока, але розподіл піків з літичною дією дещо відрізнявся. Підрахування валового виходу літичних ензимів, які гідролізують клітинні стінки мікрокока, дало наступні результати: при вирощуванні продуцента без додавання металу – 28250 од/мл, при додаванні йонів свинцю у тверде та рідке середовище – 22970 і 37000 од/мл відповідно. Це корелювало з підвищенням кількості протеїназ у останньому препараті. Отримані результати можуть свідчити про можливість індукції синтезу літичних ендопептидаз при додаванні свинцю у ферментаційне середовище.

Враховуючи те, що екстрацелюлярний комплекс *S. recifensis* var. *lyticus* є багатокомпонентною системою, нас зацікавило, як впливають важкі метали на окремі літичні ферменти комплексу. Для цього була проведена додаткова очистка ензимів, яка, окрім перелічених раніше методів, включала ще йонообмінну хроматографію на СМ-сефадексі С-50. У результаті було отриманно 5 окремих літичних ендопептидаз, які відрізнялися молекулярною масою, електричним зарядом та субстратною специфічністю [4]. Визначали вплив важких металів на прояв літичної дії ендопептидаз по відношенню до двох тест-культур: *S. aureus* та *M. lysodeikticus*. Як видно з табл. 2, є суттєві відмінності, з одного боку, між окремими ферментами, з другого – в прояві бактеріолітичної дії по відношенню до двох досліджуваних тест-культур.

Таблиця 2

Залишкова літична активність ендопептидаз під впливом важких металів

Хімічна сполука	Лізіс клітин <i>Staphylococcus aureus</i> , % до контролю				
	I	II	III	IV	V
Контроль	100	100	100	100	100
1. Pb(NO ₃) ₂	436	360	448	130	280
2. CdSO ₄	470	340	430	128	300
3. ZnSO ₄	40	270	80	170	30
4. AgNO ₃	20	32	160	30	15
5. CuSO ₄	120	28	48	32	25
	Лізіс клітин <i>Micrococcus lysodeikticus</i> , % до контролю				
	I	II	III	IV	V
Контроль	100	100	100	100	100
1. Pb(NO ₃) ₂	182	319	304	387	700
2. CdSO ₄	104	195	236	60	238
3. ZnSO ₄	104	119	161	253	23
4. AgNO ₃	0	0	30	167	38
5. CuSO ₄	162	287	247	207	613

Однак були відмічені деякі загальні закономірності. Так, універсальними активаторами усіх п'яти ендопептидаз були йони свинцю та кадмію, які підвищували літичну активність до 130–700% відносно контролю. Додатковими активаторами фракції II та IV при лізісі стафілокока були йони цинку, для фракції

V – заліза. При лізисі клітин *M. lysodeikticus* всі п'ять ендопептидаз активувалися йонами міді та свинцю (активність збільшувалась відповідно до 162–613% та 182–700% відносно контролю). Кадмій підвищував активність фракцій II, III і V (до 195–238%). Аналізуючи отримані дані, слід відмітити високий ступінь підвищення літичної активності під впливом металів, що може свідчити про належність даної групи ензимів до металопротеїназ або про важливу роль металів у формуванні фермент-субстратного комплексу.

Оскільки до складу ферментного комплексу *S. recifensis* var. *lyticus* входить ростостимулюючий фактор глікопротеїдної природи [3], було цікаво визначити, як впливають важкі метали на його активність. З цією метою було поставлено два досліді. В першому випадку вирощували тест-культуру *C. guilliermondii* у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) з глюкозою (2%) в присутності свинцю в різних концентраціях (0,0001–1%), в другому досліді до подібної системи додавали ще прогрітий ацетоновий препарат з *S. recifensis* var. *lyticus* до кінцевої концентрації 0,08% (як джерело ростостимулюючого термостійкого фактора). Встановлено, що додавання у МПБ свинцю у концентраціях від 0,0001 до 0,1% пригнічує ріст дріжджів на 24–35%, а підвищення концентрації металу до 1,0% значно знижує накопичення біомаси (на 69%). Внесення в середовище ростостимулюючого компонента призводить до підвищення показника біомаси. Додавання ж свинцю у концентраціях 0,0001, 0,001 та 0,01% ще більше підвищувало ростостимулюючий ефект (на 23, 27 та 15% відповідно) і навіть високі концентрації йонів свинцю (0,1 і 1,0%) практично не знижували приріст біомаси. Таким чином, можна констатувати не тільки наявність ростостимулюючої дії ферментного препарату з *S. recifensis* var. *lyticus*, а ще й позитивний вплив свинцю на активність ростостимулюючого фактора.

Бібліографічні посилання

1. Авиженис В. Ю. Некоторые свойства протеолитических ферментов препарата «Оризин ПК» / Авиженис В. Ю., Савицкайте И. М. // Труды АН Лит. ССР, Сер. В. – 1969. – Т. 2, № 49. – С. 181–191.
2. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа. – М.: Наука, 1969.
3. Бабенко Ю. С. Обнаружение ростстимулирующего фактора в составе комплексного лизоэнзимного препарата / Ю. С. Бабенко, Н. В. Кукушкина, Н. П. Черногор, Д. Д. Жерносеков, В. С. Феденко // Биотехнология, – 1990. – № 4. – С. 26–29.
4. Соколова И. Е. Выделение и очистка литических протеиназ из *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 / И. Е. Соколова, Ю. С. Бабенко // Прикл. биохим. и микробиология. – 1991. – Т. 27, № 1. – С. 53–60.
5. Шинкаренко Л. Н. Литические ферменты *Actinomyces recifensis* var. *lyticus* и условия, влияющие на их биосинтез. – Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1979.
6. Isono M. Bacteriolytic enzymes and process for the production thereof / M. Isono, T. Takahashi, Y. Yamadzaki. – Patent №3649454. – 1972 (USA).

Надійшла до редколегії 14.02.05