

УДК 579.22+577.15

Л. П. Бабенко, І. Є. Соколова

Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

БІОСИНТЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ ТРАНСФОРМАНТА *STREPTOMYCES RECIFENSIS*

Проведено аналіз біосинтетичної активності рекомбінантного штаму *Streptomyces recifensis* DL-7 порівняно з вихідним штамом 2R-15. Отримані ацетонові препарати з культуральної рідини двох штамів, здійснено фракціонування ферментів шляхом гельфільтрації. Встановлено, що показники літичної та протеолітичної активності рекомбінантного штаму значно вищі, ніж у вихідного штаму.

L. P. Babenko, I. E. Sokolova

Oles' Gonchar Dnipropetrovsk National University

BIOSYNTHETICAL ACTIVITY OF *STREPTOMYCES RECIFENSIS* TRANSFORMANTS

Biosynthetical activity of *Streptomyces recifensis* DL-7 recombinant strain was analysed to compare with the initial strain 2R-15. The acetone samples were obtained from cultural liquid of both strains and fractionated by gel filtration. It was shown that lytic and proteolytic activities of the recombinant strain were much higher in comparison with the initial strain 2R-15.

Вступ

Стрептоміцети досить давно привертають до себе увагу дослідників у галузях промислової мікробіології, біотехнології та генної інженерії як ефективні продуценти біологічно активних речовин [2; 6]. Понад двісті видів антибіотиків, десятки різних ферментів, гормони, стимулятори росту, незамінні амінокислоти, токсини, пігменти – ось далеко не повний список речовин, синтез яких уже відбувається у промислових масштабах із використанням стрептоміцетів [8; 10]. Постійно ведеться пошук нових продуцентів вітамінів, ліпідів, нових антибіотиків, літичних ферментів та інших видів біологічно активних сполук, необхідних для людини [5; 7].

Для отримання штамів-суперпродуцентів використовуються не тільки традиційні підходи (селекція та мутагенез), а й складніші методи – спрямованого мутагенезу, генної та білкової інженерії, які призводять до появи нових або модифікації відомих вторинних метаболітів [3; 11]. Завдяки дослідженням із генної інженерії були розроблені та успішно використовуються методи перенесення окремих генів у клітини стрептоміцетів за допомогою трансформації, кон'югації та трансдукції. Особливе досягнення – розробка методу міжродового та навіть міжродинного перенесення генів, що кодують синтез гідролітичних ферментів [2; 5; 14].

Раніше було встановлено, що штам *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* є продуцентом складного комплексу бактеріолізинів та стимулятора росту. Для створення промислових технологій актуальним є пошук оригінальних продуцентів ензимів, розробка та

оптимізація живильних середовищ, а також отримання високоактивних штамів, у тому числі за допомогою молекулярно-генетичних методів.

Мета роботи – проаналізувати біосинтетичну активність штаму *S. recifensis DL-7*, отриманого на кафедрі мікробіології та вірусології шляхом трансформації, порівняно з контрольним штамом *S. recifensis 2R-15*.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкти досліджень – штам *S. recifensis var. lyticus 2R-15* та його рекомбінантний варіант *DL-7*. Для отримання ферментних препаратів штами культивували протягом 72 годин при +28 °С на ферментаційному середовищі наступного складу (%): соєве борошно – 0,475, глюкоза – 0,070, NH_4NO_3 – 0,075, K_2HPO_4 – 0,016, $CaCO_3$ – 0,230, $CaCl_2$ – 0,156, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,069, $MnCl_2 \cdot H_2O$ – $0,13 \cdot 10^{-2}$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – $0,76 \cdot 10^{-2}$, $ZnSO_4 \cdot H_2O$ – $0,19 \cdot 10^{-4}$. Об'єм колб – 750 мл, робочий об'єм – 100 мл, швидкість обертання – 220 об./хв. Біосинтетична активність продуцентів визначалась за рівнем бактеріолітичної та протеолітичної активності.

Літичну активність визначали турбідиметричним методом. За одиницю активності приймали таку кількість ферменту, що знижувала оптичну щільність суспензії на 0,001 за 1 хв. [13]. Тест-культурою (субстратом) бактеріолітичних ферментів слугували відмиті інтактні клітини *Staphylococcus aureus* та *Micrococcus lysodeikticus*. Білок вимірювали методом Lowry або спектрофотометричним методом. Протеолітичну активність визначали методом Ансона у модифікації Авіженіса і Савіцкайте [1]. Ферментні препарати отримували з культуральної рідини, звільненої від міцелію центрифугуванням. Із метою виділення та фракціонування ферментів використовували такі методи, як осаджування білків ацетоном та гельфільтрацію на сефадексі G-75 (Pharmacia, Швеція).

Результати та їх обговорення

Для обох досліджених штамів (*S. recifensis 2R-15* та *S. recifensis DL-7*) вихідним батьківським штамом був *S. recifensis var. lyticus 2435*, виділений Л. Н. Шинкаренко із суглинистих ґрунтів Дніпропетровської області у 1972 році [12]. Він відрізнявся відносно високою літичною та протеолітичною активністю. У ферментному комплексі були виявлені також амілази, кислі та лужні протеїнази, літичні ендопептидази та глікозидази, ДНК-ази тощо [8]. Враховуючи той факт, що для стрептоміцетів характерний високий ступінь гетерогенності, проводилась постійна селекційна робота з метою підтримання високої біосинтетичної активності продуцента. У 2001 році в результаті багатоступеневої селекції з використанням мутагенезу був отриманий штам *S. recifensis 2R-15* (рифампіцинстійкий). Він відрізнявся від вихідного штаму підвищеною біосинтетичною активністю щодо продукції літичних ферментів із широким спектром дії відносно багатьох видів мікроорганізмів. У 2007 році Д. Г. Лавровою проведена робота зі створення рекомбінантних штамів стрептоміцетів на базі *S. recifensis 2R-15*. Для надання нових властивостей у клітини стрептоміцету шляхом трансформації була перенесена ДНК, виділена з антибіотикостійких штамів *Staphylococcus aureus*. Результатом роботи стала колекція трансформантів стрептоміцетів, стійких до нових видів антибіотиків. Завданням дослідження було порівняння біосинтетичної активності одного зі штамів колекції (*S. recifensis DL-7*) з вихідним рифампіцинстійким штамом (*S. recifensis 2R-15*).

Із метою одержання ферментних препаратів вихідний та рекомбінантний штами стрептоміцетів культивували послідовно на маточному та ферментаційному середовищах. Після закінчення ферментації культуральну рідину продуцентів відділяли від міцелію шляхом центрифугування, біомасу висушували та її вміст визначали за ваговою

кількістю сухого міцелію. Показники накопичення біомаси склали 4,45 та 4,25 г/л у штамів *S. recifensis DL-7* та *S. recifensis 2R-15* відповідно.

Для виділення та концентрування ензимів із культуральної рідини продуцентів проводили осадження ацетоном при температурі 0...+4 °С протягом 2 годин. Сформований осад відділяли від рідкої фази центрифугуванням (30 хв., 5000 об./хв.).

Із метою аналізу складу ферментних комплексів досліджуваних штамів отримані ацетонові препарати фракціонували на колонці з сефадексом G-75. Концентрацію білка у фракціях після гел'фільтрації визначали спектрофотометрично на СФ-26 при довжині хвилі 280 нм (рис. 1).

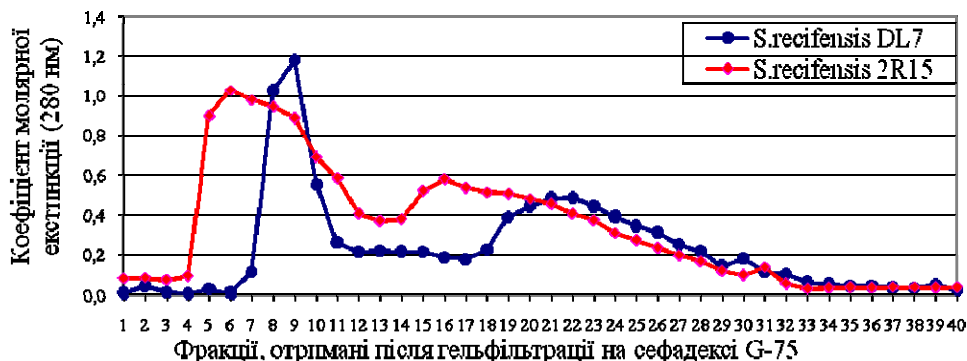


Рис. 1. Профіль елюції білка після фракціонування на сефадексі G-75 ферментних препаратів штамів *S. recifensis DL-7* та *S. recifensis 2R-15*

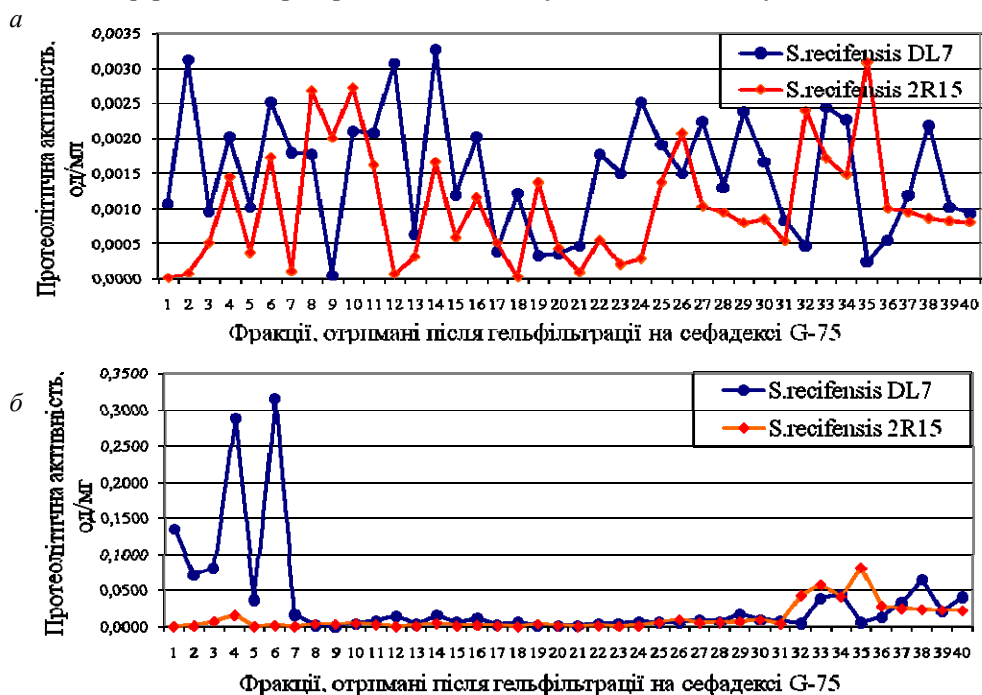


Рис. 2. Протеолітична активність вихідного та рекомбінантного штамів після гел'фільтрації на сефадексі G-75: а – од./мл, б – од./мг

Із даних графіка очевидно, що профіль білка рекомбінантного штаму *Streptomyces recifensis DL-7* суттєво змінився порівняно з вихідним штамом. Достатньо виразним показником є концентрація білка у фракціях найбільших піків – 1,18 мг/мл у 9-й фракції

рекомбінантного штаму та 1,03 мг/мл у 6-й фракції контрольного. Крім розбіжності основних білкових піків встановлено, що трансформований штам суттєво поступається вихідному у валовому виході білка ($28,1 \pm 0,4$ та $41,4 \pm 0,7$ мг відповідно), можливо, за рахунок зниження кількості баластних білків.

В отриманих після гельфільтрації фракціях визначали протеолітичну активність при використанні казеїну як субстрату (рис. 2). Профілі протеолітичної активності у *Streptomyces recifensis* DL-7 та *Streptomyces recifensis* 2R-15 суттєво відрізняються (див. рис. 2a). Слід відзначити збільшення кількості піків активності рекомбінантного штаму порівняно з контрольним (15 та 11 піків відповідно). При фракціонуванні білків рекомбінантного штаму DL-7 виявлені достатньо виражені, нетипові для вихідного штаму піки протеолітичної активності. Це свідчить про наявність у трансформованого штаму групи протеолітичних ферментів, яка відсутня або слабо синтезується вихідним штамом *Streptomyces recifensis* 2R-15. У найвищих піках питома протеолітична активність вихідного та рекомбінантного штамів суттєво відрізняється – 0,08 та 0,32 од./мг відповідно (див. рис. 2б). Спостерігається істотна різниця між штамми за сумарним виходом протеолітичних ферментів – 4,04 та 1,13 од. у *Streptomyces recifensis* DL-7 та *Streptomyces recifensis* 2R-15 відповідно.

Визначення літичної активності здійснювали турбідиметричним методом (ФЕК-56Н) шляхом оцінки різниці оптичної густини суспензії клітин *Micrococcus lysodeikticus* та *Staphylococcus aureus* до та після інкубації з ферментними препаратами. Можна відзначити наявність в обох штамів достатньої кількості гідролітичних ферментів, які проявляють літичну активність відносно клітин *M. lysodeikticus* (див. рис. 3a).

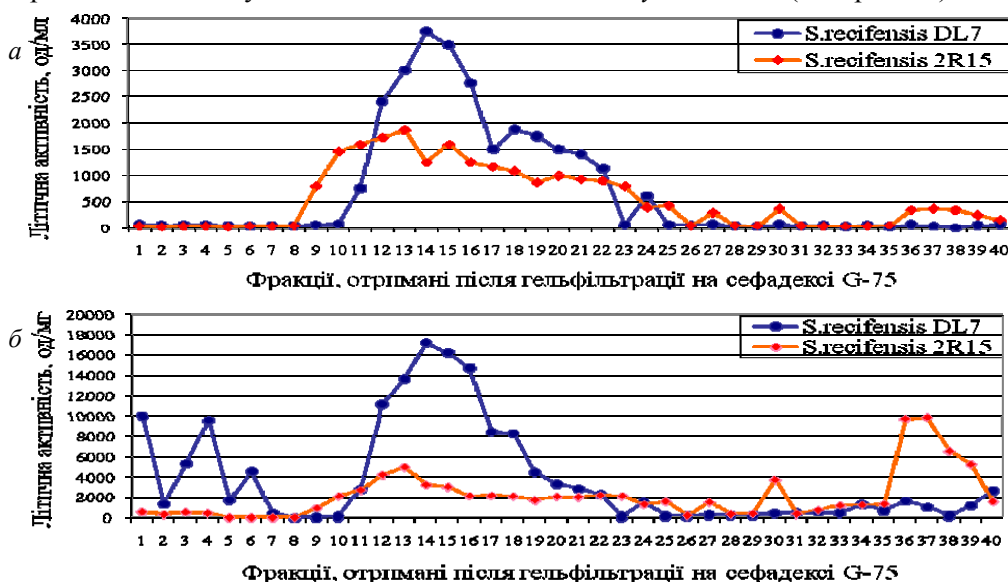


Рис. 3. Літична активність відносно клітин *Micrococcus lysodeikticus* вихідного та рекомбінантного штамів *Streptomyces recifensis* після гельфільтрації на сефадексі G-75: а – од./мл, б – од./мг

У рекомбінантного штаму ця активність виражена набагато більше. Рівень літичної активності найвищого піка трансформанта перевищує майже удвічі контроль (3750 та 1870 од./мл відповідно). При порівнянні сумарної літичної активності відносно клітин *M. lysodeikticus* виявлено, що цей показник у *S. recifensis* DL-7 удвічі більший, ніж у вихідного штаму (456 тис. та 259 тис. од. відповідно).

Визначали також літичну активність ферментних фракцій відносно клітин *Staphylococcus aureus* (рис. 4). Звертає на себе увагу значна зміна профілю літичної активності рекомбінанта порівняно з вихідним штамом. Наприклад, з'явилися два нових піки серед перших 7 фракцій. Їх питома літична активність дорівнювала 223 тис. та 195 тис. од./мг відповідно, а також один достатньо великий пік літичної активності у фракціях 25–30 (23500 од./мг). Штами суттєво відрізняються за рівнем літичної активності для найбільших піків. У *S. recifensis* DL-7 найвище значення літичної активності спостерігається у 15-й фракції та складає 4200 од./мл, а у *S. recifensis* 2R-15 – в 1-й фракції та дорівнює 2200 од./мл.

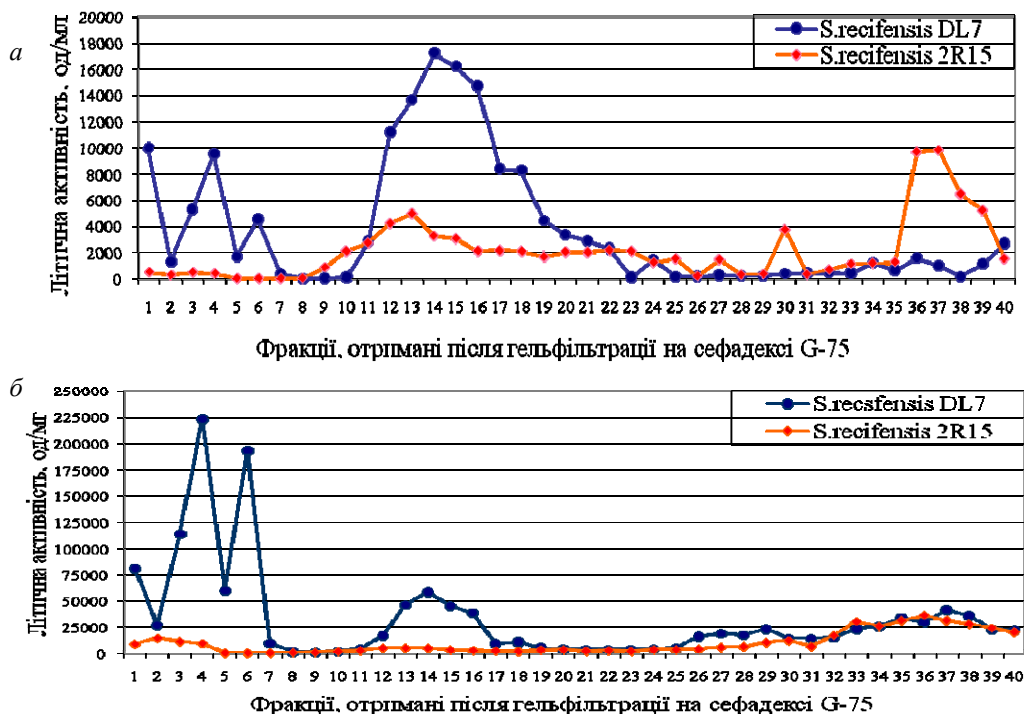


Рис. 4. Літична активність відносно *Staphylococcus aureus* вихідного та рекомбінантного штамів *Streptomyces recifensis* після гел'фільтрації на сефадексі G-75: а – од./мл, б – од./мг

Слід відзначити появу у дослідженого штаму нової групи високомолекулярних ферментів, абсолютно нетипових для вихідного штаму. Сумарна літична активність відносно клітин *Staphylococcus aureus* усіх фракцій у *S. recifensis* DL-7 і *S. recifensis* 2R-15 відрізняється в 3,5 раза та становить відповідно 4015 тис. та 1207 тис. од.

Висновки

Аналіз біосинтетичної активності рекомбінантного штаму *S. recifensis* DL-7 виявив його суттєві відмінності порівняно з вихідним штамом *S. recifensis* 2R-15. За відносно близьких значень продуктивності щодо накопичення біомаси міцелію, загальний вихід білка у трансформованого штаму нижчий. Цей факт з урахуванням високої літичної активності може свідчити про синтез специфічних ферментів і можливу блокаду синтезу інших білків. У результаті фракціонування ацетонового ферментного препарату на колонці з сефадексом G-75 отримані ферментні фракції, профіль білка в яких у рекомбінантного та контрольного штамів суттєво відрізнявся. Виявлено два окремих піки протеолітичної активності *Streptomyces recifensis* DL-7 та цілу ферментну

групу, яка не властива вихідному штаму *S. recifensis 2R-15*. Сумарний вихід протеолітичної активності рекомбінантного штаму у 3,05 раза перевищував контроль.

Дослідження літичної активності відносно клітин *Micrococcus lysodeikticus* виявило здатність рекомбінанта синтезувати високомолекулярні ферменти з високою літичною активністю, які не синтезуються контрольним штамом, а також підвищення синтезу групи ферментів із середньою молекулярною масою у 2,6 раза. Результати дослідження літичної активності відносно клітин *Staphylococcus aureus* вказували на наявність стафілолітичних ферментів у кожній фракції дослідженого штаму. Встановлено, що літична активність *S. recifensis DL-7* в окремих фракціях перевищувала контроль у 262 рази. Ураховуючи викладене, слід відзначити високу біосинтетичну активність рекомбінантного штаму *S. recifensis DL-7* та можливість його використання для отримання препаратів літичних ферментів.

Бібліографічні посилання

1. **Авиженис В. Ю.** Некоторые свойства протеолитических ферментов препарата «Оризин ПК» / В. Ю. Авиженис, И. М. Савицкайте // Труды АН Лит. ССР. – 1969. – Т. 2, № 49. – С. 181–191.
2. **Валагурова У. В.** Стрептомицеты рода *Streptomyces* / У. В. Валагурова, В. Е. Козырицкая, Г. А. Иутинская – К. : Наукова думка, 2003. – 647 с.
3. **Глик Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Д. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 589 с.
4. **Лакин Г. Ф.** Биометрия. – М. : Высшая школа, 1980. – 293 с.
5. **Мацелюх А. Б.** Стрептомицети – продуценти полікетидних антибіотиків // Мікробіол. журн. – 2003. – Т. 65, № 1–2. – С. 168–181.
6. **Мікробіологія** / И. Л. Дикий, Н. Е. Холупяк, И. Ю. Шевелева, М. Ю. Стегний. – К. : Проф., 2004. – 624 с.
7. **Практична мікробіологія** / С. І. Климяк, І. О. Ситник, М. С. Творко, В. П. Ширококов. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2004. – 440 с.
8. **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.
9. **Соколова И. Е.** Биосинтетическая активность *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* / И. Е. Соколова, Т. П. Килочек, А. И. Винников // Мікробіологічний журнал. – 2004. – Т. 66, № 6. – С. 17–22.
10. **Технологія** получения биологически активных веществ. Ч. 2. Промышленная технология производства ГЛС и фитопрепаратов. – Х. : Изд-во НФАУ “Золотые страницы”, 2002. – 96 с.
11. **Федоренко В. О.** Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів / В. О. Федоренко, Б. О. Осташ, М. В. Гончар. – Львів : ЛНУ, 2005. – 356 с.
12. **Шинкаренко Л. Н.** Литические ферменты *Actinomyces recifensis* var. *lyticus* и условия, влияющие на их биосинтез. – Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1979.
13. **Isono M.** Bacteriolytic enzymes and process for the production thereof / M. Isono, T. Takahashi, Y. Yamadzaki – Patent №3649454. – 1972 (USA).
14. **Pankevych K.** Cloning and sequencing of a putative positive transcription regulator gene of landomycin biosynthetic cluster of *Streptomyces globisporus* 1912 / K. Pankevych, H. Kruegel, V. Fedorenko // Visnyk of Lviv Univ. Biology Series. – 2001. – Is. 27. – P. 97–105.

Надійшла до редколегії 12.03.2009