

УДК 579.22

І. В. Жерносекова

Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ СТРЕПТОМИЦЕТУ ЗА ПРИСУТНОСТІ РОСЛИННИХ ОЛІЙ

Установлено підвищення біосинтетичної здатності стрептоміцету штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 за присутності рослинних олій. Максимальні показники накопичення біомаси та активності стафілолітичних ферментів штаму 2P-15 більші на 19 та 20 %, а концентрація екзогенного білка – у 9 разів при культивуванні стрептоміцету на змішаному субстраті (глюкоза та олія соняшника), ніж на бісубстратному середовищі (глюкоза та маслинова олія). Середовище, що містило олію соняшника або маслинову (моносубстрат), не сприяло інтенсифікації біосинтетичної активності стрептоміцету. Проте максимальні показники моносубстратних варіантів дослідів вищі за присутності олії соняшника, ніж маслини.

И. В. Жерносекова

Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара

ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ СТРЕПТОМИЦЕТА В ПРИСУТСТВИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ

Установлено повышение биосинтетической способности стрептомицета штамма *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 в присутствии растительных масел. Максимальные накопление биомассы и активность стафилолитических ферментов штамма 2P-15 выше на 19 и 20 %, а концентрация экзогенного белка – в 9 раз при культивировании стрептомицета на смешанном субстрате (глюкоза и масло подсолнечника), чем на бисубстратной среде (глюкоза и оливковое масло). Среда, содержащая масло подсолнечника либо оливковое (моносубстрат), не способствовала интенсификации биосинтетической активности стрептомицета. Однако максимальные показатели моносубстратных вариантов опытов были выше в присутствии масла подсолнечника, чем оливкового.

I. V. Zhernosekova

Oles Honchar Dnipropetrovs'k National University

STREPTOMYCETES BIOSYNTHESIS PROCESSES IN THE PRESENCE OF VEGETABLE OILS

The rise of biosynthesis activity of the strain *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 induced by vegetable oil was established. When cultivating the streptomycetes in the mixed medium (glucose and sunflower oil) the maximum biomass accumulation and staphylolytic enzymes' activity of the strain 2P-15 increased by 19 and 20 % respectively in comparison with the streptomycetes grown in the medium of glucose and olive oil. The concentration of exogenic protein was also 9 times more for glucose and sunflower oil substrate. Monosubstrate of sunflower or olive oil didn't increase the biosynthetic activity of the strain. However, the maximal indices were higher for sunflower oil than for olive one.

Вступ

Продуценти біологічно активних речовин давно привертають увагу вчених у зв'язку з можливістю отримання на їх основі мікробних препаратів, які як альтернатива хімічним безпечні для навколишнього середовища [8; 10]. Хімічні препарати накопичуються у ґрунті, воді, продуктах харчування та шкодять здоров'ю людини. Тому розробка біопрепаратів мікробного походження залишається актуальним питанням сучасності [1; 4; 5]. Одержання ефективних препаратів потребує підтримання штамів мікроорганізмів в активному фізіологічному стані. Підвищити біосинтетичну здатність продуцентів біологічно активних речовин без втручання в геном можливо за рахунок зміни складу живильного середовища, а також шляхом унесення до нього додаткових, або вторинних джерел вуглецю [6; 7].

У літературі широко показано прийом заміни одного джерела вуглецю іншим, або присутність обох джерел у середовищі, що дозволяє значно підвищити синтез активних речовин продуцентом [7; 13; 17]. Джерелом вуглецю та енергії для мікробної клітини можуть виступати рослинні олії. Відомості про ріст мікроорганізмів із використанням олій і продукцію ними активних речовин обмежені. Невелика кількість праць із використанням рапсової, соєвої олій і складових жирів присвячена синтезу ліпаз, лимонної кислоти, спіраміцину [11; 15–17]. У зв'язку зі здатністю штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 синтезувати біологічно активні сполуки, на основі яких можливе створення біопрепарату, стало цікавим дослідити можливість підвищити активність продуцента шляхом використання рослинних олій як джерела вуглецю. Мета цієї роботи – оцінити біосинтетичні процеси стрептоміцету штаму 2P-15 в умовах глибинного культивування за присутності у середовищі рослинних олій соняшника або маслини.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт дослідження – штам *S. recifensis* var. *lyticus* 2P-15, стійкий до рифампіцину, який синтезує літичні ферменти. Культивування штаму здійснювали протягом 72 годин при +28 °С, 220 об./хв на ферментаційному середовищі, склад якого наведено у публікації [9]. Додатково до середовища вносили олію соняшника або маслини в концентрації 0,5 % на фоні основного джерела вуглецю – глюкози (бісубстратне середовище), використовували ті ж самі олії, але на фоні виключення глюкози (моносубстратне середовище). За контроль брали середовище, що містило тільки глюкозу. Накопичення біомаси стрептоміцетом визначали ваговим методом і виражали в мг/мл, активність стафілолітичних ферментів – як показано в [9], концентрацію екзогенного білка в культуральній рідині – методом Bradford [14].

Результати та їх обговорення

Вивчення впливу рослинних олій на накопичення біомаси стрептоміцетом показало, що у контрольному середовищі, де джерелом вуглецю слугувала глюкоза, максимальний показник біомаси становив 72 мг/мл на 48-му годину культивування. Комбінація глюкози та олії соняшника (бісубстратне середовище) збільшила приріст біомаси до 74 мг/мл, але це спостерігалось на 12 годин раніше за контроль (табл. 1). Подібний результат накопичення максимальної кількості клітин бактеріями на середовищі з різними типами вуглецю, яке зміщене уперед на добу, показано авторами на *B. subtilis* ІМВ В-7023 [13]. Проте олія, як єдине джерело вуглецю, сприяла повільному накопиченню біомаси, яке набуло найбільшого значення тільки на третю добу (див. табл. 1). Це – наслідок неможливості оптимального використання олії продуцентом.

У літературі повідомляється, що різноманітні олії можуть частково замінити у середовищі глюкозу. Продуцент окситетрацикліну – *A. rimosus* – використовує соняшникову олію на 60 %. Проте вага міцелію за наявності олії вища за контроль [3]. Повільніше біомаса зростала на бісубстратному середовищі з маслиновою олією. У даних умовах дослідіу максимальне значення біомаси спостерігали наприкінці культивування продуценту, але її кількість знижено на 19 % порівняно з експериментами, де використано комбінований субстрат з олією соняшника. Відомо, що маслинова олія важко засвоюється мікроорганізмами через її низьке йодне число, що зумовлює гущішу консистенцію, важке окислення та складну метаболізацію [2].

Таблиця 1

Накопичення біомаси штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 за присутності жирів у середовищі культивування

Варіант дослідіу	Термін культивування, години											
	12		24		36		48		60		72	
	<i>M</i> ± <i>m</i> , мг/мл	<i>K</i> , %	<i>M</i> ± <i>m</i> , мг/мл	<i>K</i> , %	<i>M</i> ± <i>m</i> , мг/мл	<i>K</i> , %	<i>M</i> ± <i>m</i> , мг/мл	<i>K</i> , %	<i>M</i> ± <i>m</i> , мг/мл	<i>K</i> , %	<i>M</i> ± <i>m</i> , мг/мл	<i>K</i> , %
Контроль (глюкоза)	36 ± 0,02	100	43 ± 0,03	100	50 ± 0,01	100	72 ± 0,88	100	47 ± 0,01	100	50 ± 0,23	100
Глюкоза + соняшникові олія	54 ± 0,31*	150	57 ± 0,51*	133	74 ± 0,05*	148	49 ± 1,02*	68	64 ± 0,06*	136	60 ± 0,31*	120
Соняшникові олія	47 ± 0,46*	131	50 ± 0,32*	116	55 ± 0,21*	110	59 ± 0,04*	82	54 ± 0,18*	115	70 ± 0,04*	140
Глюкоза + маслинова олія	43 ± 0,81*	119	45 ± 1,01	105	60 ± 0,12*	120	49 ± 0,05*	68	62 ± 0,12*	132	51 ± 0,07*	102
Маслинова олія	37 ± 0,12*	103	40 ± 0,03*	93	40 ± 0,32*	80	43 ± 0,13*	60	48 ± 0,61	102	49 ± 0,25*	98

Примітка: * – $p < 0,05$.

Використання бісубстратних середовищ порівняно з моносубстратними позитивно вплинуло на активність літичних ферментів, які руйнують клітинну стінку стафілокока (табл. 2). Пік активності стафілолізинів на бісубстратному середовищі (глюкоза та олія соняшника), виявлений на 60-ту годину культивування, перевищив значення контролю на 92 %. На іншому бісубстраті пік активності ферментів був нижчим за перший на 20 %, однак активність стафілолізинів перевищувала контрольний рівень на 39 %. Отже, надлишок вуглецевого живлення для стрептоміцету достовірно збільшив активність даної групи ферментів. Культивування стрептоміцету на моносубстратних середовищах за присутності тільки олії (або соняшника, або маслини) не викликало підвищення активності ензимів.

Аналогічні результати щодо збільшення кількості або активації синтезу біологічно активних сполук в умовах комбінованих бісубстратних середовищ наведено в низці праць [12; 17; 18]. Автори підкреслюють, що наявність двох субстратів у середовищі стимулювала продукцію спіраміцину, а його кількість збільшено на 62 % за наявності соєвої олії та пропілового спирту [16]. Присутність гліцеролу та соєвої олії у середовищі дозволила авторам підвищити синтез поверхнево-активних речовин [18].

Існують дані про можливість активувати синтез целюлітичних ферментів у бактерій *B. subtilis* завдяки присутності джерела вуглецю *Na*-КМЦ та індуктора целюлаз (кукурудзяний екстракт) [12].

Комбіноване середовище із соняшниковою олією викликало збільшення концентрації екзогенного білка у культуральній рідині штаму, значення якого сягнуло

2,3 мг/мл. Цей показник зріс у 9 разів порівняно з подібним, але отриманим на бісубстраті з маслиновою олією.

Таблиця 2

Літична активність штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 за присутності жирів у середовищі культивування

Варіант досліджу	Термін культивування, години											
	12		24		36		48		60		72	
	<i>M</i> ± <i>m</i> , од./мл	<i>K</i> , %	<i>M</i> ± <i>m</i> , од./мл	<i>K</i> , %	<i>M</i> ± <i>m</i> , од./мл	<i>K</i> , %	<i>M</i> ± <i>m</i> , од./мл	<i>K</i> , %	<i>M</i> ± <i>m</i> , од./мл	<i>K</i> , %	<i>M</i> ± <i>m</i> , од./мл	<i>K</i> , %
Контроль (глюкоза)	119 ± 0,7	100	146 ± 0,8	100	166 ± 0,6	100	255 ± 2,1	100	278 ± 1,5	100	311 ± 0,8	100
Глюкоза + соняшникова олія	185 ± 0,5*	155	199 ± 0,4*	136	294 ± 0,9*	177	355 ± 0,4*	144	533 ± 2,0*	192	507 ± 0,9*	163
Соняшникова олія	115 ± 0,4*	97	150 ± 0,3*	103	173 ± 1,7*	104	246 ± 0,3*	97	249 ± 0,6*	90	268 ± 1,1*	98
Глюкоза + маслинова олія	110 ± 2,2*	92	117 ± 1,7*	80	205 ± 0,2*	124	444 ± 0,2*	139	366 ± 0,3*	132	422 ± 1,9*	136
Маслинова олія	148 ± 2,7*	99	106 ± 2,1*	73	123 ± 1,8*	74	164 ± 1,2*	64	205 ± 1,2*	74	266 ± 0,5*	86

Примітка: * – $p < 0,05$.

Олія соняшника як моносубстрат сприяла повільному збільшенню концентрації білка, але його показник був меншим на 10 % проти комбінованого середовища з цією олією. Використання маслинової олії як у комплексному середовищі, так і моносубстраті не забезпечило підвищення концентрації позаклітинного білка у штаму 2P-15.

Висновки

Показано позитивну дію бісубстратних середовищ, що містили глюкозу та олію соняшника або маслини над моносубстратними, при культивуванні стрептоміцету штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15. В умовах надлишку вуглецевого живлення (за присутності олії соняшника) збільшуються накопичення біомаси штаму на 19 %, активність стафілолітичних ферментів – на 20 %, а концентрація екзогенного білка – у 9 разів. Маслинова олія як моно- та бісубстрат не сприяла інтенсифікації активності продуцента.

Бібліографічні посилання

1. **Бега З. Т.** Вплив бентоніту на ефективність бактеризації насіння рослин / З. Т. Бега, І. К. Курдиш // Мікробіол. журн. – 2011. – Т. 73, № 4. – С. 54–61.
2. **Безбородов А. М.** Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. – Л. : Медицина, 1969. – 246 с.
3. **Біотехнологія:** Уч. посіб. для вузов в 8 кн. / Под ред. Н. С. Егорова. – Кн. 1. – М. : Высш. шк., 1987. – 159 с.
4. **Влияние** биопрепаратов на динамику численности бактерий и фитопатогенных грибов в агроэкосистеме картофеля / Н. В. Патица, В. В. Бородай, Н. В. Житкевич и др. // Мікробіол. журн. – 2012. – Т. 74, № 2. – С. 82–85.
5. **Вплив** бактеріального препарату комплексної дії на ріст декоративних рослин / Н. В. Чуйко, З. Т. Бега, Л. В. Булаченко, І. К. Курдиш // Мікробіологія і біотехнологія. – 2010. – № 2. – С. 43–50.
6. **Вплив pH** поживного середовища на біосинтез гідролітичних ферментів у баціл / Л. В. Авдеева, А. І. Осадча, Л. А. Сафронова та ін. // Мікробіол. журн. – 2010. – Т. 72, № 5. – С. 3–7.

7. **Вплив** лимонної кислоти на синтез поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас – 5017 / Т. П. Пирог, Т. А. Шевчук, М. О. Шулякова, Д. О. Тарасенко // Мікробіол. журн. – 2011. – Т. 73, № 5. – С. 21–27.
8. **Курдиш І. К.** Інтродукція мікроорганізмів у агроєкосистеми. – К. : Наукова думка, 2010. – 255 с.
9. **Методи** планирования экспериментов при оптимизации питательной среды для стрептомицета / И. В. Жерносекова, Н. П. Черногор, А. А. Тымчук, А. И. Винников // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. – 2010. – Вип. 18, т. 1. – С. 20–28.
10. **Мікробні** препарати у землеробстві / За ред. В.М. Волкогона. – К. : Аграрна наука, 2006. – 311 с.
11. **Особенности** роста на рапсовом масле и синтеза лимонной и изолимонной кислот у дрожжей *Yarrowia lipolytica* / С. В. Камзолова, Т. В. Финогенова, Ю. Н. Лунина и др. // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 1. – С. 26–31.
12. **Скрининг** штаммов бактерий с высокой целлюлазной активностью / А. И. Осадчая, Л. А. Сафронова, Л. В. Авдеева, В. М. Иляш // Мікробіол. журн. – 2009. – Т. 71, № 5. – С. 41–48.
13. **Церковняк Л. С.** Синтез амінокислот *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 у середовищі з гліцерофосфатом / Л. С. Церковняк, А. О. Рой, І. К. Курдиш // Мікробіол. журн. – 2009. – Т. 71, № 5. – С. 18–23.
14. **Bradford M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 721. – P. 1117–1123.
15. **Characterization** of an extracellular lipase encoded by *Lip2* in *Yarrowia lipolytica* / G. Pignede, H. Wang, F. Fudalej et al. // J. Bacteriol. – 2000. – Vol. 182. – P. 2802–2810.
16. **Influence** of short-chain fatty acids on the production of spiramycin by *Streptomyces ambofaciens* / S. Khaona, A. Lebrihi, M. Laakel et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1992. – Vol. 36. – P. 763–767.
17. **Jin Z. H.** Improved production of spiramycin by mutant *Streptomyces ambofaciens* / Z. H. Jin, P. L. Cen // J. Zhejiang Univ. SCI. – 2004. – Vol. 5, N 6. – P. 689–695.
18. **Production** of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn drage supplemented with glycerol and soybean oil / D. C. Neto, C. Bugay, A. P. de Santana-Filho et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 89, N 5. – P. 1395–1403.

Надійшла до редколегії 19.06.2012