

УДК 575.224.46 + 575.827.5

О.М. Пагер, Т.В. Майданюк,  
Т.С. Тодосійчук**ВИКОРИСТАННЯ УЛЬТРАФІОЛЕТОВОГО  
ВИПРОМІНЮВАННЯ В СЕЛЕКЦІЇ ПРО-  
ДУЦЕНТА ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСУ  
р. *STREPTOMYCES*****Вступ**

Традиційні методи селекції мікробних продуцентів біологічно активних речовин, незважаючи на їх трудомісткість, лишаються актуальними і зараз, оскільки дають можливість отримувати надпродуценти з високим рівнем синтезу цільових продуктів. Сучасні прийоми відбору і створення високоактивних продуцентів пов'язані з оптимізацією схеми селекції, в якій традиційні методи використовуються в модифікаціях або нових комбінаціях [1].

Очевидно, що об'єктами селекції стають культури, що синтезують продукти, які вже знайшли практичне використання або мають потенційні перспективи широкого застосування в різних галузях господарства і промисловості. До таких речовин належить бактеріолітичний ферментний комплекс, продуцентом якого є культура актиноміцету *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*. Попередні дослідження культури показали, що до складу даного ферментного комплексу входять глікозидази, літичні ендopeптидази, мурамідази, протеїнази та амілази, комплексна дія яких призводить до руйнування широкого спектра мікробних клітин [2, 3]. Така специфічність сприяє розгляданню ферментного комплексу як основи антисептичних засобів побутового і медичного призначення.

На основі вихідної культури *Str. recifensis* var. *lyticus* дослідники селекціонували ряд штамів-продуцентів, які відрізнялися за рівнем біосинтезу продукту та його бактеріолітичною специфічністю [4–6]. Один із них (штам 2435/М) було використано при розробці технології бактеріолітичного ферментного препарату циторецифен, що може бути застосований у складі мийних засобів з антисептичним ефектом, а також медичних протимікробних препаратів поверхневої дії [7–9].

Однак використання будь-якого продуцента передбачає постійну селекційну роботу з підтримки та підвищення його біосинтетичної

здатності, яка має загальну тенденцію до зниження внаслідок природної гетерогенності мікробних популяцій. Саме тому, зважаючи на практичну цінність названої культури і зниження біосинтетичної активності використовованого штаму, актуальною видається робота з отримання нового штаму-продуцента на основі *Str. recifensis* var. *lyticus*.

Аналіз сучасних методів і прийомів у селекції мікробних продуцентів біологічно активних речовин свідчить про важливе значення генотипу вихідного штаму для отримання надпродуцента, а також про доцільність багатостадійної обробки культури послідовно різними типами мутагенів [10, 11]. Так, використання УФ-випромінювання дає змогу отримати мутанти родів *Bacillus* і *Coniothyrium* з підвищеним у два–десять разів рівнем біосинтезу [12, 13]. Ступінчаста обробка УФ-випромінюванням і хімічними мутагенами також є ефективною в селекції продуцентів р. *Streptomyces*, р. *Pseudomonas* та ін. [14, 15]. Незважаючи на загальні закономірності, отримання надпродуцента на основі певної культури залишається справою тривалого підбору типу та дози мутагену, а також схеми обробки.

**Постановка задачі**

Потенційно широкі сфери практичного застосування ферментного комплексу, що синтезується *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435/М, зумовлюють необхідність підтримуючої селекції культури та отримання штаму з більш високим рівнем біосинтезу продукту. Встановлення впливу мутагенів різної природи, особливо таких, що раніше не використовувалися в селекції даної культури (УФ-випромінювання), на біосинтетичну здатність культури дасть змогу оптимізувати процес отримання надпродуцента загалом. Тому метою даного дослідження було вивчення мінливості штаму *Str. recifensis* var. *lyticus* 2435/М і виявлення впливу ультрафіолетового випромінювання на культуру для встановлення можливості використання його при відборі штаму з надсинтезом цільового продукту.

**Матеріали і методи досліджень**

Використовувався штам *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435/М з музею кафедри промислової біотехнології НТУУ "КПІ", отриманий раніше із застосуванням хімічного мутагену [4]. Культура вирощувалась на агаризова-

ному середовищі Чапека при температурі  $28 \pm 1$  °C впродовж семи діб.

Гетерогенність популяції і мінливість культури оцінювалась за ознакою бактеріолітичної активності окремих клонів, що характеризувались індексом літичної активності (ІЛА) і визначались як відношення діаметра зони лізису тест-культури в середовищі до діаметра самої колонії [4].

Для визначення ІЛА окремі клони культури пересівались уколом на середовище такого складу (г/дм<sup>3</sup>): NaNO<sub>3</sub> – 2,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 1,0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,5; NaCl – 0,5; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,1; CaCO<sub>3</sub> – 3,0; агар-агар – 20; прогріта 30 хв при 90 °C суспензія тест-культури  $9 \cdot 10^9$  кл/см<sup>3</sup> (як єдине джерело органічного живлення). Як тест-культури використовувались *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, вирощені на МПА.

Вплив мутагену, ультрафіолетового випромінювання (УФ-випромінювання), визначався за рівнем виживання культури та за рівнем біосинтетичної здатності отриманих мутантів.

Мутагенез проводився таким чином. Спорова суспензія досліджуваної культури у фізіологічному розчині ( $1 \cdot 10^7$  клітин/см<sup>3</sup>) опромінювалась у чашках Петрі (10 мл суспензії) при перемішуванні. Опромінення проводилось УФ-лампю потужністю 40 Вт (з довжиною хвилі 254–255 нм) на відстані 30 см впродовж 30–100 с. При розсіванні відповідного розведення опроміненої і вихідної суспензії на середовище Чапека визначався рівень виживання культури за різних доз мутагену.

Мутанти, отримані при рівнях виживання культури 0,1–1 %, аналізувались на здатність до синтезу продукту (бактеріолітичного ферментного комплексу) за ІЛА, визначалась мінливість культури за цією ознакою та відбирались плюс-варіанти з підвищеним рівнем синтезу.

Мінливість культури за ознакою ІЛА виражалась коефіцієнтом варіації ІЛА:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} \cdot 100, \%$$

де  $\sigma$  – середнє квадратичне відхилення у вибірці;  $\bar{X}$  – середнє арифметичне значення.

Біосинтетична здатність штамів характеризувалась також відсотком виникнення при розсіві “плюс”- та “мінус”-варіантів, тобто клонів, ІЛА яких відрізняється від середнього значення на дві величини стандартного відхилення:  $|\bar{X} + 2\sigma|$  і  $|\bar{X} - 2\sigma|$ .

Статистична обробка даних здійснювалась за допомогою програми Excel Microsoft Office XP.

### Результати і їх обговорення

Використаний у даній статті штам *Str. Re-cifensis* var. *lyticus* 2435/М був раніше селекціонований з використанням N-нітрито-N-метилсечовини і мав підвищену в 2,5 раза біосинтетичну здатність відносно батьківського штаму [7]. Впродовж тривалого терміну зберігання біосинтетична здатність штаму знизилася і на сьогодні є вищою від вихідного штаму приблизно в 1,5 раза. Зниження продуктивності культури відбулося, очевидно, внаслідок гетерогенності популяції і збільшення кількості низькоактивних клонів. Тому, зважаючи на практичне значення продуцента, актуальною задачею є підтримуюча селекція штаму та використання нових схем отримання варіантів із підвищеною активністю.

Оскільки в селекції даного продуцента раніше не використовувався фізичний мутагенез, видалося важливим дослідити вплив УФ-випромінювання на біосинтетичну здатність культури та можливість використання такого типу мутагену в селекції штаму.

На першому етапі роботи визначалась мінливість культури за ознакою бактеріолітичної активності, для чого переколювались окремі клони культури на середовище з тест-культурою та визначались індекси їх літичної активності. При дослідженні розсіву спонтанних клонів спостерігалось збільшення середнього значення ІЛА окремих клонів з 3-ї до 5-ї доби росту, однак вияв бактеріолітичної активності (а отже, й синтез відповідних компонентів продукту) не однаковий щодо застосованих тест-культур (табл. 1). Так, відносно лізису грамнегативної культури впродовж вирощування відбувається зниження мінливості штаму (зниження коефіцієнта варіації з 15,4 до 13,5 %) та одночасне істотне підвищення ІЛА<sub>сеп.</sub> Стафілолітична активність клонів також зростає, хоча не так значно, але при цьому зростає мінливість культури за цією ознакою.

Слід зазначити, що досліджуваний штам раніше був селекціонований саме за переважаючою стафілолітичною активністю і не відзначався високою здатністю до лізису грамнегативних культур. Вірогідно, встановлена вища літична активність відносно *E. coli* (ІЛА<sub>сеп.</sub> > 4) є наслідком мінливості культури щодо синтезу

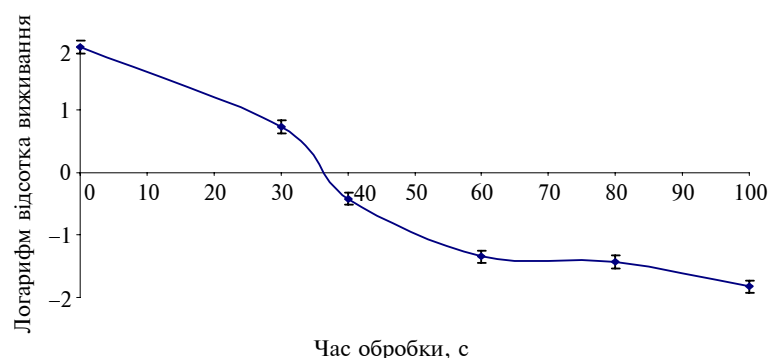
компонентів ферментного комплексу, здатних руйнувати клітинну стінку грамнегативних організмів.

**Таблиця 1.** Динаміка мінливості спонтанних варіантів *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435/М

Час вирощування, доба	Індекс літичної активності ІЛА <sub>сер</sub>	Середньоквадратичне відхилення $\sigma$	Коефіцієнт варіації ІЛА CV, %	Стандартна похибка, %
Тест-культура <i>E. coli</i>				
3	2,5	0,4	15,4	1
5	4,1	0,6	13,5	1
Тест-культура <i>St. aureus</i>				
3	2,2	0,3	11,7	1
5	3,1	0,6	18,7	2

На наступному етапі роботи визначався вплив УФ-випромінювання на виживання досліджуваного штаму *Str. recifensis* var. *lyticus* 2435/М. Дані, наведені на рис. 1, дають можливість визначити інтервал часу обробки спорової суспензії культури, що призводить до виживання культури на рівні 0,1–1%. Саме при такому рівні виживання мікробних культур при дії мутагену існує велика вірогідність утворення мутантів із зміненою біосинтетичною здатністю [1, 5]. У логарифмічних координатах такий відсоток виживання відповідає часу обробки від 40 до 50 с, а більш ніж 90%-на загибель клітин культури відбувається після 30-секундного опромінювання.

Для проведення мутагенезу на наступному етапі використовувався встановлений режим обробки (40 с, потужність лампи 40 Вт), що відповідає дозі опромінювання 240 Дж/м<sup>2</sup>.



**Рис. 1.** Вплив часу обробки спорової суспензії штаму *Str. recifensis* var. *lyticus* 2435/М УФ-випромінюванням на рівень виживання культури

Опромінена та контрольна суспензії спор культури у відповідному розведенні висівались на чашки Петрі із середовищем Чапека, а потім переколювались на середовища з вмістом тест-культур *Escherichia coli* і *Staphylococcus aureus*.

Аналіз розсіву клонів вихідної та опроміненої культури виявляє істотний вплив мутагенної обробки на гетерогенність культури та її здатність до лізису грамнегативних культур (рис. 2). Так, вже на третю добу росту в розсіві мутантних клонів відбувається перерозподіл клонів у бік підвищення частини високоактивних варіантів відносно неопроміненої культури (рис. 2, а, б).

На п'яту добу вирощування ця тенденція посилюється (рис. 2, в), що виявляється не лише в істотному підвищенні відсотка високоактивних клонів у розсіві мутантів (ІЛА > 4), а й появі 3–5% клонів з ІЛА > 6, які були взагалі відсутні в популяції вихідної культури (рис. 2, в). Отримані результати вказують на позитивний ефект УФ-випромінювання на здатність до синтезу досліджуваним продуцентом ферментного комплексу, активного відносно грамнегативних культур (*E. coli*).

Аналіз ІЛА розсіву клонів вихідної та опроміненої суспензії культури відносно *St. aureus* також виявив позитивний ефект мутагенезу, однак максимальні абсолютні значення ІЛА розсіву поступалися таким, що виявлялися щодо *E. coli* (рис. 3).

Так, на третю добу вирощування ІЛА вихідної культури не перевищував трьох одиниць, натомість у розсіві мутантів на цей період з'являється до 10% клонів з ІЛА = 3–4 та до 5% клонів з ІЛА > 4 (рис. 3, а, в). Подальше вирощування культури призводить до появи в розсіві мутантів переважаючої кількості клонів з ІЛА = 3–4 та до 5% високоактивних клонів з ІЛА = 5–6 (рис. 3, в).

Підвищення бактеріолітичної активності культури, за даними попередніх досліджень [4, 7], може свідчити або про загальне збільшення синтезу продукту, або про зміну спрямованості біосинтетичної здатності *Str. recifensis* var. *lyticus* у бік підвищення вмісту ферменту N-ацетилмурамідази, що відіграє важливу роль у процесі лізису клітин, забезпечуючи умови для прояву активності інших літичних ферментів комплексу – пептидаз, протеїназ. Дослідження механізму впливу використаного мутагену на біо-

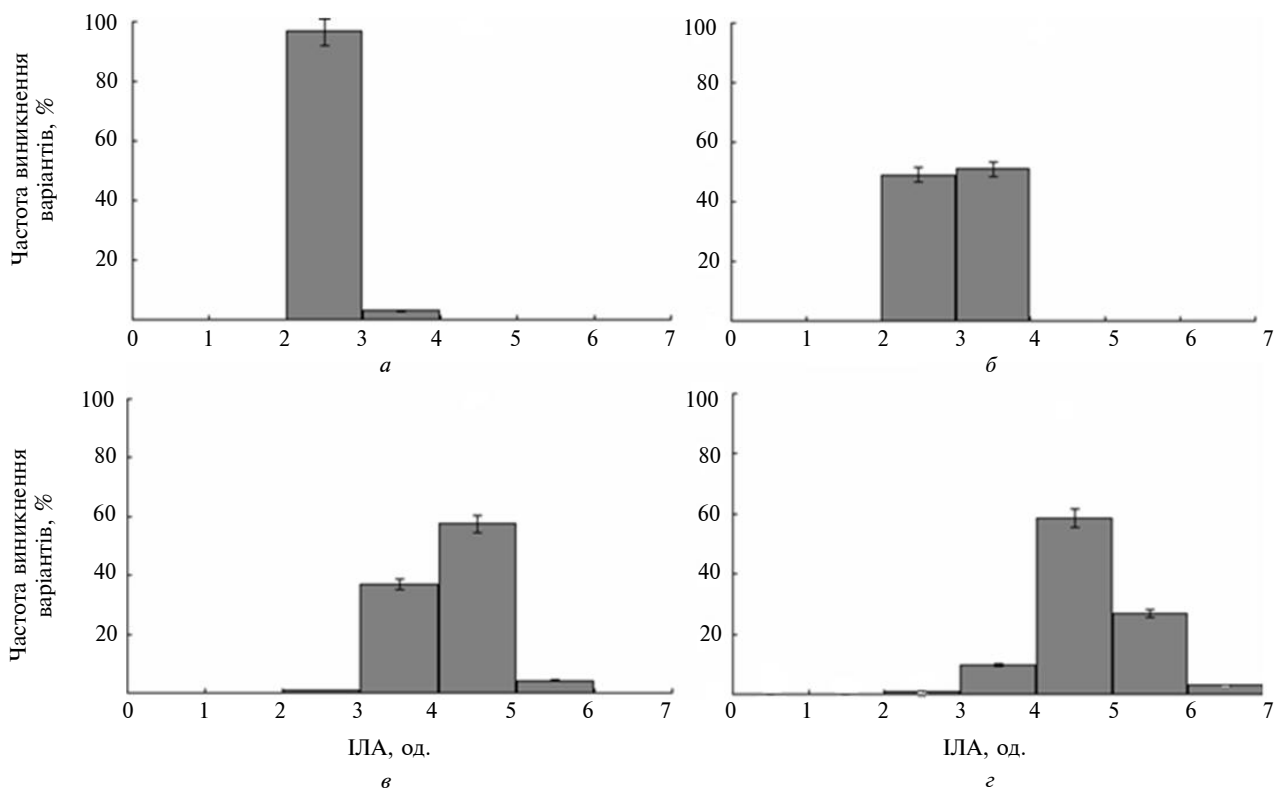


Рис. 2. Розподіл ІЛА клонів відносно *E. coli*: а, б – 3-я доба росту; в, г – 5-а доба росту; а, в – вихідна культура; б, г – опромінена культура

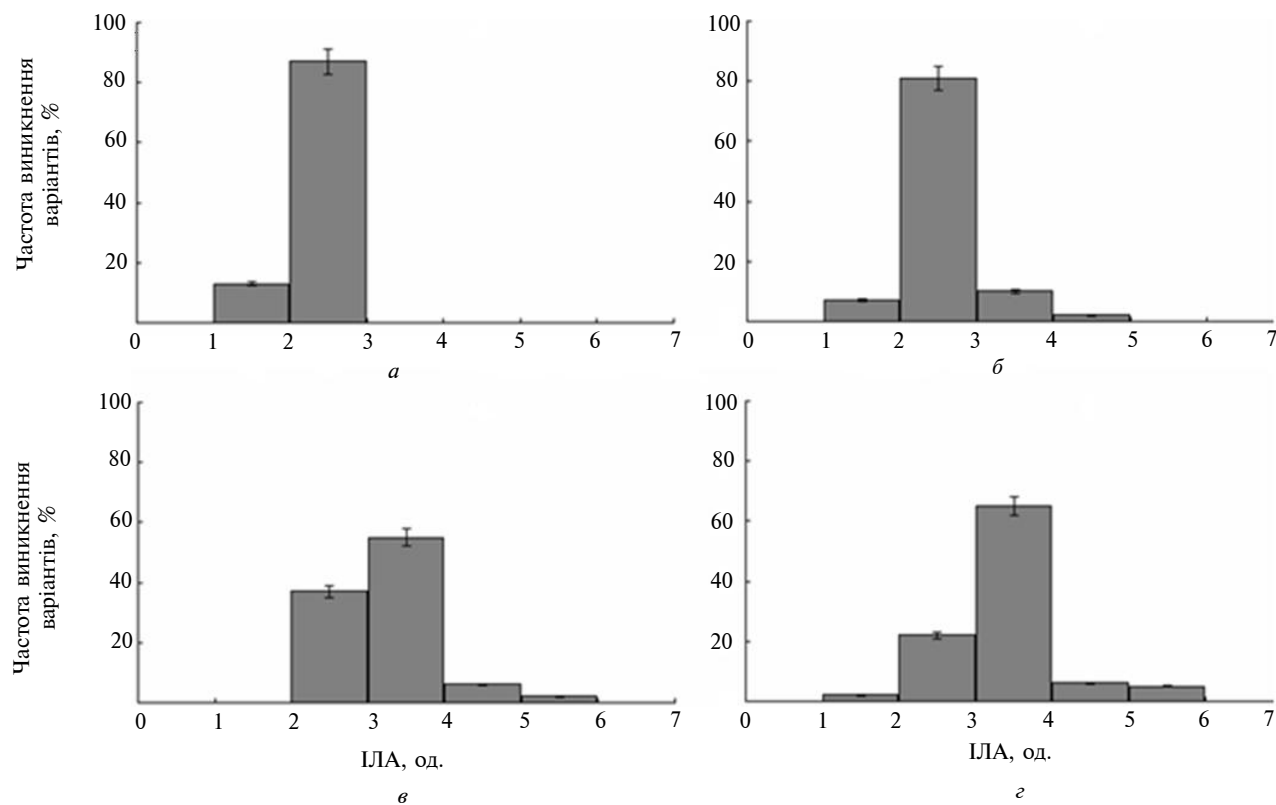


Рис. 3. Розподіл ІЛА клонів на середовищі з *St. aureus*: а, б – 3-я доба росту; в, г – 5-а доба росту; а, в – вихідна культура; б, г – опромінена культура

синтетичну здатність культури є важливим фактором при оптимізації схеми селекції даного продуцента загалом, тому потребує подальшого окремого детального вивчення.

Дослідження динаміки мінливості мутантної культури *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435/М на рівні виживання 0,4 % порівняно з вихідною показало, що мінливість культури наприкінці вирощування загалом лишається на тому ж рівні і коливається в межах похибки (табл. 2). Так, коефіцієнти варіацій в усіх порівняннях точках (див. також табл. 1) є майже однаковими, за винятком 3-ї доби вирощування на середовищі із стафілококом (CV = 22 %), однак на 5-у добу росту мінливість вихідної та мутантної культур відрізняється на величину похибки. Очевидно, що використання такого типу мутагену не призводить до підвищення мінливості досліджуваної культури за ознакою бактеріолітичної активності.

**Таблиця 2.** Динаміка мінливості варіантів *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435/М, оброблених УФ-випромінюванням

Час вирощування, доба	Вживаність, %	Індекс літичної активності ІЛА <sub>сер</sub>	Середньоквадратичне відхилення $\sigma$	Коефіцієнт варіації ІЛА CV, %	Стандартна похибка, %
Тест-культура <i>E. coli</i>					
3	0,4	2,9	0,4	14,0	1
5	0,4	4,6	0,6	12,7	1
Тест-культура <i>St. aureus</i>					
3	0,4	2,4	0,5	22,0	2
5	0,4	3,4	0,7	20,3	2

Наведені результати свідчать про позитивний вплив УФ-випромінювання на біосинтетичну здатність *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*, що виявляється в підвищенні відсотка високоактивних клонів у розсіві культури та появі частини клонів з істотно збільшеним рівнем синтезу бактеріолітичного ферментного комплексу. Саме вони є потенційними надпродуцентами цільового продукту, тому останній етап дослідження полягав в аналізі частоти виникнення таких клонів (плюс-варіантів), а також відборі клонів з максимальними ІЛА для подальших досліджень та практичної роботи.

Подані в табл. 3 дані дають змогу порівняти частоту виникнення клонів з мінімальною та максимальною активністю у вихідної та мутантної культур впродовж вирощування. Очевидно,

**Таблиця 3.** Частота виникнення плюс- і мінус-варіантів при розсіві спонтанних та мутантних клонів *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435/М

Час вирощування, доба	Спонтанні варіанти/мутантні варіанти, %			
	Плюс-варіанти	Мінус-варіанти	Плюс-варіанти	Мінус-варіанти
	<i>E. coli</i>		<i>St. aureus</i>	
3	2,5/3,4	0,8/5,5	1,7/4,1	4,3/2,1
5	3,3/4,1	0,8/2,1	5,2/4,8	0/2,8

практично в усіх випадках частота виникнення плюс- і мінус-варіантів культури-мутанта порівняно з вихідною культурою підвищується, що свідчить про зростання гетерогенності популяції. Однак вміст цих варіантів є незначним і коливається в межах 2–5,5 %. Поряд з цим, попередні дані вказують на істотне зростання ІЛА основної маси клонів розсіву мутанта (див. рис. 2, 3), що визначають біосинтетичну активність культури загалом.

При аналізі плюс-варіантів, що були отримані при культивуванні на середовищах з різними тест-культурами, крім абсолютної величини ІЛА, наприкінці вирощування враховувалась також швидкість вияву високої біосинтетичної здатності. Такі варіанти мають додаткові переваги в практичному застосуванні, оскільки дають змогу скоротити тривалість етапу виробничого біосинтезу продукту та створюють селективні умови вирощування продуцента, зважаючи на специфічність продукту.

За такими ознаками серед розсіву мутантних клонів *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* для подальшої роботи було відібрано два варіанти: E96 (145 % від рівня активності вихідного штаму відносно *E. coli*) та S101 (190 % від рівня активності вихідного штаму відносно *St. aureus*).

## Висновки

Вперше встановлено позитивний вплив УФ-випромінювання на біосинтетичну здатність культури *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*, а також його ефективну дозу (240 Дж/м<sup>2</sup>) та доцільність використання мутагену в селекції даного продуцента ферментного комплексу.

У результаті проведеного мутагенезу з використанням УФ-випромінювання отримані два мутанти – *Str. recifensis* var. *lyticus* E96 і S101, що відрізняються підвищеним в 1,5 та 2

рази рівнем синтезу цільового продукту відносно до грамнегативних та грампозитивних мікроорганізмів, відповідно.

Подальші дослідження із врахуванням встановлених особливостей впливу УФ-випромінювання на бактеріолітичну специфічність

ферментного комплексу мають бути спрямовані на визначення механізму дії мутагену на метаболізм продуцента та оптимізацію його застосування для отримання стабільних надпродуцентів з контрольованою специфічністю.

О.Н. Пагер, Т.В. Майданюк, Т.С. Тодосійчук

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ В СЕЛЕКЦИИ ПРОДУЦЕНТА ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА р. *STREPTOMYCES*

Исследовано влияние ультрафиолетового излучения на биосинтетическую способность культуры продуцента бактериолитического ферментного комплекса *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* и показана целесообразность применения мутагена данного типа в селекции штаммов с повышенным уровнем синтеза продукта. По результатам проведенной мутагенной обработки культуры для дальнейшей работы отобраны два варианта – *Str. recifensis* var. *lyticus* E96 и S101, которые отличаются повышенным в полтора и два раза уровнем синтеза целевого продукта, соответственно.

O.M. Pager, T.V. Majdanjuk, T.S. Todosiychuk

THE USE OF ULTRA-VIOLET RADIATION IN SELECTION OF ENZYME COMPLEX PRODUCER OF *STREPTOMYCES*

We investigate the influence of ultra-violet radiation on the biosynthetic ability of the culture of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* bacteriolytic enzyme complex producer. We demonstrate that this type of mutagen can be applied to selection of the strain with the high level of product synthesis. The results of the conducted mutagen processing of culture allow choosing two variants of culture – *Str. recifensis* var. *lyticus* E96 and S101 which have the enhanced level of a target product synthesis by 1,5 and 2 times.

1. Дебабов В.Г. Селекция микроорганизмов на заре XXI века // Биотехнология. – 2005. – № 4. – С. 3–19 с.
2. Шинкаренко Л.М., Тодосійчук Т.С., Хоккер Х. Дослідження компонентного складу і специфічності літичного ферментного комплексу *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* IMB Ac-5001 // Наукові вісті НТУУ “КПІ”. – 2004. – № 1. – С. 138–143.
3. Бабенко Ю.С., Шинкаренко Л.Н., Килочек Т.П. Регуляция биосинтеза литических ферментов штаммом *Actinomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 // Тез. докл. V съезда Укр. микробиол. общества. – К., 1980. – С. 25.
4. Тодосійчук Т.С., Шинкаренко Л.М., Федоренко В.О., Басілія Л.І. Отримання мутантів *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* зі зміненою бактеріолітичною активністю // Мікробіол. журн. – 1998. – № 4. – С. 49–56.
5. Жерносекова І.В. Мінливість продуцента літичних ферментів *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* та його селекція: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.07. – К.: Ін-т мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. – 2002. – 20 с.
6. Жерносекова І.В., Винников А.И. Увеличение активности продуцента литических ферментов *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* в процессе селекции // Вест. ДНУ. – 2004. – Вып. 12, т. 2. – С. 52–56.
7. Тодосійчук Т.С. Розробка технології гідролітичного ферментного препарату циторецифен: Автореф. дис. ... канд. техн. наук: 03.00.20. – К., 2000. – 25 с.
8. Шинкаренко Л.М., Жолнер Л.Г., Тодосійчук Т.С. Визначення спектра дії ферментного препарату з *Str. recifensis* var. *lyticus* 2435/М // Експрес-новини: наука, техніка, виробництво. – 1998. – № 4. – С. 49.
9. Лукашева Е.В., Трешалина Е.М., Березов Т.Т. Перспективы использования ферментов в терапии // Матер. конгр. “Биотехнология: состояние и перспективы”. – М., 2005. – 166 с.
10. Громико О., Федоренко В. Вплив мутагенів на антибіотичну активність *Streptomyces nogalater* IMET 43360 – продуцента протипухлинного антибіотика ногаламіцину // Вісник. – Львів, 2005. – Вип. 40. – С. 16–22.
11. Мацелюх Б.П., Лаврінчук В.Я. Одержання і характеристика мутантів *Streptomyces globisporus* 1912, дефектних по біосинтезу ландоміцину Е // Мікробіол. журн. – 1999. – 61, № 4. – С. 23–27.
12. Solaiman E.A.M., Hegazy Wafaa K. and Moharam Maysa E. Induction of overproducing alkaline protease *Bacillus* mutants through UV irradiation // Arab J. Biotech. – 2005. – 8, N 1. – P. 49–60.

13. *Zantinge J.L., Huang H.C., Cheng K.-J.* Induction, screening and identification of *Coniothyrium minitans* mutants with enhanced  $\beta$ -glucanase activity // *Enzyme and Microbial Technology.* – 2003. – **32**, N 2. – P. 224–230.
14. *Xiang-Jing Wang, Xiao-Chong Wang, Wen-Sheng Xiang.* Improvement of milbemycin-producing *Streptomyces bingchenggensis* by rational screening of ultraviolet and chemically induced mutants // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – 45 с.
15. *Caob S.G., Zhanga K.C.* Production, properties and application to non-aqueous enzymatic catalysis of lipase from newly isolated pseudomonas strain // *Enzyme and Microbial. Technology.* – 2000. – **27**. – P. 74–82.

Рекомендована Радою  
факультету біотехнології і біотехніки  
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції  
12 березня 2010 року