

УДК 577.152.3

Т.С. Годосійчук, Д.А. Гордєєв, Т.І. Іздебська, С.М. Яремчук

АЛЬТЕРНАТИВНІ КОМПОНЕНТИ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ АКТИНОМІЦЕТІВ – ПРОДУЦЕНТІВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Taking into account the wide-spread of such group as actinomycetes among industrial producers, we use one of its representatives (*Streptomyces recifensis* var. *lyticus* – a producer of a lytic enzyme complex) as a model for studying alternative components which can be utilized for optimization of nutrient mediums for actinomycetes. We study the influence of alternative components of nutrient mediums on biosynthetic processes of culture *Str. recifensis* var. *lyticus* and define the possibility of their use for optimization of nutrient mediums for actinomycetes. The research results establish that whey can't be used as a component of nutrient mediums for the given culture. Using pea and rape flour in some cases reduces the efficiency of culture by 20–40 %. Blackstrap use increases the culture efficiency and specific activity of a product by 1,5–2 times and allows reducing the medium price by 1,3 times. Finally, we demonstrate the influence of nutrition sources on biosynthesis orientation, as well as the efficiency and economic feasibility of blackstrap use in the medium composition.

Вступ

Ефективність біосинтезу біологічно активних речовин значною мірою визначається складом поживного середовища культивування. Субстрати і середовища, що використовуються в біотехнології, досить різноманітні, і їх кількість постійно збільшується. З розвитком промислових процесів відбувається накопичення нових видів відходів, які можуть бути використані в біотехнологічному виробництві [1]. Для поживних середовищ, що застосовуються у промисловості, головним є повноцінність для накопичення максимальної кількості біомаси або продуктів біосинтезу. При виборі сировини слід враховувати не лише фізіологічні потреби вибраного продуцента, але і її вартість, що визначає собівартість кінцевого продукту. Оскільки у світі існує проблема вичерпання традиційних видів сировини, то виникає необхідність у розширенні сировинної бази або використанні повною мірою відходів місцевої промисловості.

Сільськогосподарські культури та продукти їх переробки є багатими джерелами живлення. Традиційно в поживних середовищах для багатьох культур використовують соєве борошно, крохмаль, кукурудзяний екстракт. Останнім часом розширюється спектр застосування ріпаку. Вміст у сім'ї ріпаку 35–50 % жиру, 19–31 % білка, 5–7 % клітковини, а також невелика вартість відкривають можливість його використання в складі поживного середовища як джерела вуглецю та азоту. Не менш цікавими для мікробіологічного виробництва є горохове борошно (до складу якого входять білки,

жири, вуглеводи) та м'ясо-кісткове борошно (білки – 50 %, зола – 35 %, жири – 12 %).

Серед відходів харчової промисловості, що отримуються у великих кількостях, можна назвати сироватку та мелясу. Молочна сироватка містить білки, жири та вуглеводи. Останні представлені лактозою, тому можливість утилізувати такий компонент певною мікробною культурою потрібно визначати окремо. Меляса як компонент поживних середовищ поширена у багатотоннажних виробництвах етилового спирту та кормового білка і рідко використовується у виробництві біологічно активних речовин. Однак її склад дає можливість прогнозувати ефективність її застосування у складі поживних середовищ для біосинтезу інших продуктів.

Актиноміцети є однією з найпоширеніших груп промислових продуцентів різних біологічно активних речовин, серед яких найбільш відомі мікроорганізми, що продукують антибіотики та ферменти. Більшість із них належить до роду *Streptomyces* [2–4]. Однією з таких культур є *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*, що синтезує бактеріолітичний ферментний комплекс, здатний руйнувати мікробні клітини. Така специфічність дає змогу розглядати його як основу антисептичних засобів побутового та медичного призначення, а отже, широкі сфери застосування, що показано в ряді досліджень [5, 6].

Актуальність розробок з використанням вказаного продуцента та належність цієї культури до одного з найпоширеніших родів актиноміцетів – продуцентів біологічно активних речовин (роду *Streptomyces*), дає можливість використати його як модельний об'єкт для ви-

значення впливу альтернативних джерел живлення на його біосинтетичну активність. Отримані дані можуть бути основою для оптимізації складу поживних середовищ для інших продуцентів-актиноміцетів роду *Streptomyces*, а можливо, й інших представників цієї групи.

Постановка задачі

Як джерела вуглецю та азоту для біосинтезу ферментного комплексу культурою *Str. recifensis var. lyticus* традиційно використовують соєве борошно і глюкозу або крохмаль [7]. Зважаючи на наявність на вітчизняному ринку різних видів сировини, доцільним було вивчити можливість їх заміни на більш дешеві компоненти або на такі, що сприятимуть підвищенню біосинтезу продукту. Тому за результатами аналізу літератури, а також вивчення сучасного асортименту сировини як альтернативних компонентів живлення у поживних середовищах для біосинтезу було запропоновано дослідити таку сировину, як ріпак, сироватку, горохове борошно, мелясу.

Мета роботи – визначити вплив альтернативних компонентів поживних середовищ на біосинтетичну активність культури актиноміцету *Str. recifensis var. lyticus* та встановити можливість використання їх у складі промислових середовищ для оптимізації технології виробництва ферментного препарату.

Матеріали і методи досліджень

У роботі використовували штами *Str. recifensis var. lyticus* US101, AE52, 2435/М з музею кафебри промислової біотехнології НТУУ “КПІ”, отримані раніше з використанням мутагенів: N-нітрозоз-N-метилсечовини (штам 2435/М), ультрафіолетового опромінення (US101) та азотистої кислоти (штам AE52) [4]. Штами підтримували на агаризованому середовищі Чапека при температурі 28 ± 1 °C упродовж 7 діб.

Отримання посівного матеріалу проводили на рідкому середовищі Чапека у колбах на 250 мл зі 100 мл поживного середовища на качалках при частоті обертання 220 хв^{-1} протягом 48 год при температурі 28 °C. Біосинтез проводили у колбах на 750 мл із 150 мл ферментаційного середовища, на качалках при частоті обертання 240 хв^{-1} протягом 72–96 год при температурі 28 ± 1 °C. Для біосинтезу ферментного комплексу використовували базове середовище такого складу (г/л): глюкоза – 6,0; соєве борошно

дезодороване – 8,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 5,8; NaCl – 14,0; CaCl_2 – 4,5; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,04; H_2O дист. – до 1л, pH = 7,8–8,2. Досліджувані альтернативні компоненти (ріпакове борошно (№ 2), горохове борошно (№ 1), мелясу (№ 3), сироватку (№ 4)) вносили у поживні середовища в кількостях, що в теоретичному розрахунку відповідали кількості компонента, який замінювався. Так, у базовому середовищі (№ 5) замінювали соєве борошно на горохове або ріпакове, які вносили у кількостях 8,0 г/л; мелясу вносили замість глюкози до концентрації у середовищі 30 г/л; сироватку (суху) використовували як альтернативу білкового живлення (соєвого борошна) і вносили у середовище відповідно до вмісту білка – 8,0 г/л.

Визначення білка проводили методом Лоурі. Концентрацію біомаси визначали ваговим методом, висушуючи відділений центрифугуванням міцелій при 105 °C до постійної ваги та виражали її у міліграмах на мілілітр культуральної рідини. Продуктивність культури оцінювали відношенням величини біосинтетичної (літичної) активності до концентрації біомаси в культуральній рідині та виражали в умовних одиницях на міліграм біомаси.

Літичну активність (ЛА) визначали турбідиметричним методом [8]. Для визначення літичної активності використовували суспензію дводобових тест-культур *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* з оптичною густиною 0,7–0,8 ОД (при 540 нм, кюветі 0,5 см). За одиницю літичної активності брали кількість ферменту, яка знижує оптичну густину суспензії тест-культури на 0,001 за 1 хв у 1 мл реакційної суміші при 50 °C, при розведенні культуральної рідини, що забезпечує лізис клітинної суспензії на 25–30 %. Питому літичну активність розраховували відносно кількості білка в 1 мл культуральної рідини і виражали в умовних одиницях на міліграм білка.

Визначення літичної активності культуральної рідини проводили у такій модифікації: до 4 мл суспензії тест-культури додавали 0,1–0,3 мл культуральної рідини та інкубували впродовж 10 хв при 50 °C. У контроль додавали 0,1–0,3 мл дистильованої води та інкубували в тих самих умовах. За різницею оптичної густини суспензії до (ОД_n) та після (ОД_k) інкубації визначали рівень ЛА. Оптичну густину визначали на спектрофотометрі КФК-3 при $\lambda =$

= 540 нм у кюветі 0,5 см на фоні дистильованої води.

Літичну активність визначали за формулою

$$ЛА = \frac{(ОД_п - ОД_к \cdot C) \cdot N}{0,001 \cdot \tau}, \text{ од/мл,}$$

де C – коефіцієнт автолізу (відношення $ОД_п/ОД_к$ контролю); N – розведення проби в реакційній суміші, раз; τ – час інкубації, хв.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми Excel Microsoft Office XP.

Результати і їх обговорення

На підготовлених варіантах поживних середовищ з альтернативними компонентами (ріпакове борошно, горохове борошно, меляса, сироватка) вирощували штами культури *Str. recifensis var. lyticus* US101, AE52, 2435/М та визначали вплив компонентів на біосинтетичну активність культури. Вплив оцінювали за показниками продуктивності штамів і питомою літичною активністю синтезованого продукту. Як базове (контрольне) використовували поживне середовище на основі соєвого борошна, що було на попередніх етапах роботи з продуцентом вибрано як оптимальне для біосинтезу. [7] Крім основного завдання визначали також штам, що має оптимальні біосинтетичні показники і є більш перспективним серед вибраних для подальшої роботи.

Оскільки культура синтезує літичний ферментний комплекс, що містить окремі ферменти, умови біосинтезу можуть впливати на кількісне їх співвідношення у кінцевому продукті. Тому визначення продуктивності проводили

щодо синтезу комплексу ферментів, які здатні лізувати клітини грампозитивних, грамнегативних та дріжджових культур – *St. aureus*, *E. coli*, *Sac. cerevisiae* відповідно.

Подані на рис. 1 дані вказують на значний вплив основних компонентів поживних середовищ на продуктивність досліджуваних штамів. Загальні тенденції подібні для всіх штамів, а отже, для даної культури загалом. Так, максимальна продуктивність культури щодо синтезу ферментів різної специфічності проявляється на середовищі на основі меляси, і її значення переважають дані контролю (середовища із соєвим борошном) у середньому вдвічі. Очевидно також, що сироватка не може розглядатися як компонент живлення для даної культури, оскільки в усіх варіантах синтез і ріст практично не відбувалися.

Слід відмітити певні особливості біосинтезу, що проявляє культура та окремі штами. Відомо, що серед комплексу ферментів культури переважають бактеріолізینی, а дріжджолітичні ферменти синтезуються в мінімальній кількості [5]. Однак здатність до синтезу дріжджолізинів виявилася різною в досліджених штамів – найменша у штаму AE52, а найвища – у штаму US101, причому на середовищі з гороховим борошном. Меляса як основний компонент живлення в цьому випадку не має суттєвих переваг над іншими дослідженими компонентами, а всі види борошна проявляють подібний вплив.

Продуктивність штамів щодо синтезу бактеріолізинів, ефективних до різних типів бактеріальних клітин, також різниться. Так, всі штами є більш ефективними продуцентами ферментів, що руйнують грамнегативні клітини (*E. coli*). Всі досліджувані види борошна в по-

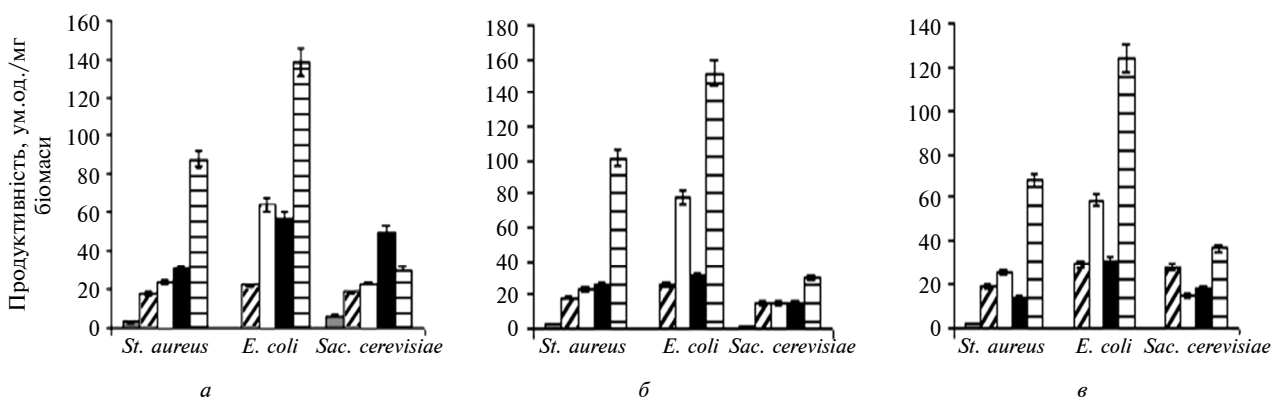


Рис. 1. Продуктивність досліджуваних штамів *Str. recifensis var. lyticus* на поживних середовищах: ■ – сироватка, ▨ – ріпакове борошно, □ – соєве борошно (контрольне), ■ – горохове борошно, ▤ – меляса; а – штам US101, б – штам AE52, в – штам 2435/М

живних середовищах порівняно з контролем майже удвічі знижують рівень синтезу ферментів цього спрямування. Протилежне спостерігається при порівнянні процесів синтезу комплексу ферментів, що руйнують грампозитивні клітини. У цьому випадку використання різних видів борошна (в т.ч. контрольного – соєвого) дає близький рівень продуктивності всіх штамів – $\pm 5\text{--}10\%$.

Це свідчить про здатність компонентів досліджуваних видів борошна впливати на спрямованість синтезу ферментів комплексу, і такий вплив є мінімальним щодо продукування дріжджолізінів і ферментів, що руйнують грампозитивні клітини. До складу борошна з бобових входять білки, жири, вуглеводи, а також крохмаль, насичені жирні кислоти, зола, мікроелементи (Ca, Mg, K, P) та вітаміни (A, B1, B2, E, PP, бета-каротин). Очевидно, окремі компоненти у їх складі можуть впливати як ростові речовини або стимулятори специфічної метаболічної активності.

Крім продуктивності культури, що проявляється при вирощуванні на різних поживних середовищах, важливими є якісні характеристики кінцевого продукту та супутній синтез баластних речовин. Надлишкова кількість баластних продуктів біосинтезу призводить до ускладнення процесу виділення продукту, особливо у випадку, коли вони однієї природи. Це стосується й досліджуваної культури, що синтезує ферментний комплекс (білок), а у складі поживних середовищ (різні види борошна) міститься велика кількість білка. Тому в роботі визначали питому літичну активність штамів на різних середовищах. Це показує співвідношення кількості продукту та білкового баласту наприкінці культивування.

За даними діаграм (рис. 2) видно, що найвища питома літична активність всіх штамів, а отже, найнижчий вміст баластних білків, визначається при вирощуванні культур на поживному середовищі з мелясою. Загальні тенденції впливу досліджуваних компонентів на спрямованість біосинтезу ферментного комплексу різними штамми культури подібні, не зважаючи на відмінності при їх отриманні з застосуванням різних мутагенів, а отже, можливістю зміни метаболічних процесів. Це дає підстави прогнозувати аналогічний вплив використаних компонентів середовищ й на біосинтетичні процеси інших штамів культури та інших видів актиноміцетів роду *Streptomyces*.

Особливе значення має склад поживного середовища для продуцентів комплексних продуктів, що містять кілька індивідуальних компонентів, наприклад ферментних комплексів, антибіотичних речовин. У цьому випадку зміна складу середовища або співвідношень окремих компонентів може призводити до підвищення або зниження синтезу окремих компонентів продукту.

Аналізуючи отримані результати (рис. 1 і 2), бачимо, що найвищої продуктивності, а також питомої літичної активності продукту щодо більшості тест-культур було досягнуто на поживному середовищі, у складі якого як основне джерело вуглецевого живлення була меляса. Меляса має складний і не постійний хімічний склад, до якого входять азотисті сполуки, переважно аміди, вуглеводи, зола (мінеральні речовини) та мікроелементи. Як мінеральні речовини в мелясі містяться K_2O , MgO , CaO . За такого складу культура отримує збалансоване харчування по всіх необхідних компонентах, ростові речовини, що, очевидно, й обумовлює отримані дані.

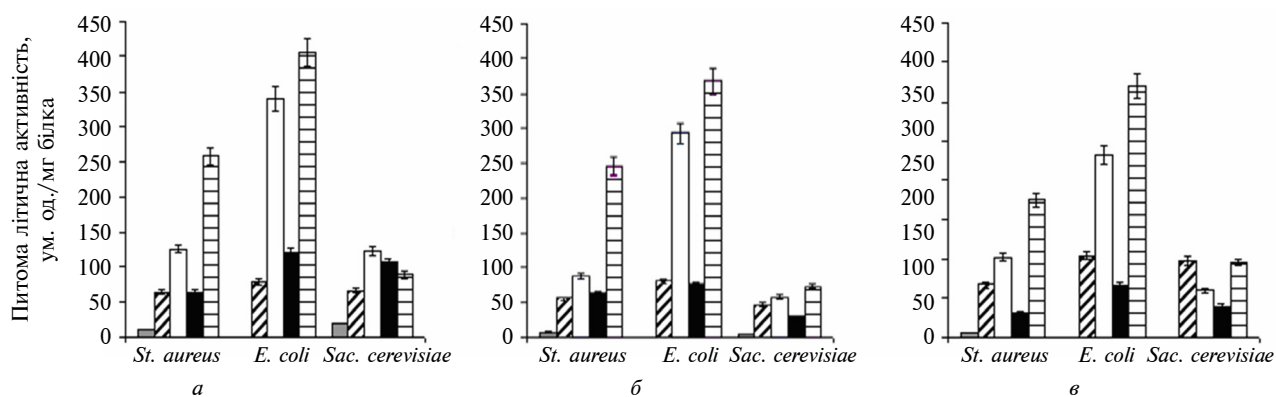


Рис. 2. Питома літична активність досліджуваних штамів *Str. recifensis* var. *lyticus* на поживних середовищах: ■ – сироватка, ▨ – ріпакове борошно, □ – соєве борошно (контрольне), ■ – горохове борошно, ▤ – меляса; а – штам US101, б – штам AE52, в – штам 2435/M

Порівнюючи вплив окремих компонентів середовища на питому літичну активність (а отже, метаболізм культури), можна відмітити деякі закономірності. Так, синтез дріжджолізинів найменше залежить від типу основних джерел живлення, оскільки питома літична активність ферментного препарату щодо *Sac. cerevisiae* коливається в межах 5–10 % в усіх досліджуваних штамів. Однак її рівень на різних середовищах дещо вищий (більше 100 ум.од./мг) у штаму US101 порівняно з іншими штамми. До того ж лише в цьому випадку питома активність продукту такої спрямованості не є максимальною при отриманні на м'ясному середовищі: високий рівень активності визначається й при біосинтезі продукту з використанням соєвого та ріпакового борошна. Цікавою відмінністю селекціонованого мутантного штаму US101 є здатність до часткової утилізації сироватки, про що свідчать дані рис. 1 і 2.

Використання горохового та ріпакового борошна у складі поживних середовищ у більшості досліджуваних варіантах дає близькі результати активності продукту, однак рівень останньої менший, ніж біосинтетичної активності культури при вирощуванні на соєвому борошні (контроль) та м'ясні. Загальною особливістю спектра літичної активності ферментних комплексів всіх досліджуваних штамів є підвищена здатність руйнувати клітини грамнегативних бактерій (на моделі *E. coli*) порівняно із грампозитивними та дріжджовими організмами.

При виборі сировини для поживних середовищ враховують не лише фізіологічні потреби продуцента та рівень синтезу продукту, але й вартість сировини. Тому було розглянуто економічний аспект використаних поживних середовищ.

Штами культури *Str. recifensis var. lyticus* вирощували на поживних середовищах, що мали однаковий сольовий склад ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaCl$, $CaCl_2$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$), але відрізнялись за джерелом вуглецю та азоту.

Отже, розраховували вартість змінної частини поживних середовищ, що містили досліджувані компоненти, не враховуючи вартість солей, витрати на які будуть однакові. Для розрахунку було досліджено ринок сировини в Україні станом на 2011 р. За даними Комерційної Української Біржі, ТОВ "Бакалейное дело", ПП. Смола Н.М., ТОВ "Агроекспорт", ТОВ "Киевмолторг", ТОВ "Веллтоп" визначено вартість використаної сировини (рис. 3).

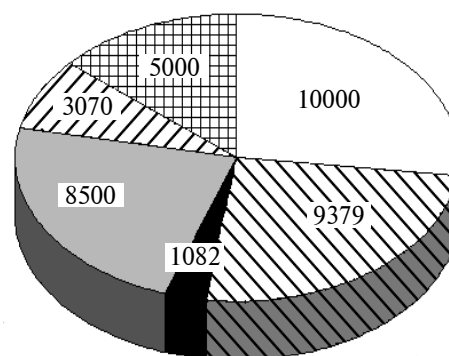


Рис. 3. Вартість сировини (грн/т) станом на 2011 р.: □ – горохове борошно; ▤ – глюкоза; ■ – м'яса; ▨ – сироватка; ▩ – ріпак; ▧ – соєве борошно

Розрахунок вартості основних компонентів досліджуваних поживних середовищ проводили на прикладі виробничого циклу ферментації з об'ємами ферментерів, що типові для отримання продуктів такого призначення – ферментні препарати промислового та побутового призначення.

Для біосинтезу таких продуктів, як правило, використовують ферментери об'ємом 10 м³, коефіцієнт заповнення яких поживним середовищем становить у середньому 65 %. З урахуванням концентрацій основних поживних компонентів середовищ, наведених у матеріалах і методах досліджень, та прийнятих обсягів стадії біосинтезу було розраховано вартість середовищ на основі дослідженої сировини.

Таблиця. Вартість основних компонентів поживних середовища для біосинтезу ферментного комплексу культурою *Str. recifensis var. lyticus* (на один виробничий цикл)

Поживне середовище	Горохове борошно	Глюкоза	М'яса	Сироватка	Ріпак	Соєве борошно	Вартість, грн
1	+	+	–	–	–	–	886
2	–	+	–	–	+	–	561
3	–	–	+	–	–	+	470
4	–	+	–	+	–	–	808
5 (контроль)	–	+	–	–	–	+	626

З наведених розрахунків (таблиця) видно, що найдешевшим є поживне середовище № 3 на основі меляси та соєвого борошна, а найвищу вартість мають середовища на основі горохового борошна та ріпаку.

При порівнянні даних продуктивності та питомої літичної активності досліджуваної культури про вирощування на даних середовищах очевидними є переваги меляси як компонента. Її застосування у складі поживного середовища для даної культури дає змогу не лише підвищити продуктивність культури, а й зменшити вартість середовища порівняно з контрольним у 1,3 разу. Застосування горохового борошна та сироватки як базових компонентів середовищ для стрептоміцету, очевидно, не має сенсу, зважаючи на високу вартість та низькі біосинтетичні показники культури. Ріпак може розглядатися як альтернатива соєвому борошну у випадку отримання дріжджолітичного ферментного комплексу.

Висновки

У рамках проведеного дослідження альтернативних компонентів живлення для біосинтезу ферментного комплексу культурою актиноміцету *Str. recifensis* var. *lyticus* експериментально та з урахуванням економічного розрахунку показано доцільність використання меляси у складі поживного середовища.

Застосування меляси у складі поживного середовища дає можливість підвищити продуктивність культури актиноміцета в 1,5–2 рази при зниженні вартості середовища у 1,3 разу. Показано здатність основних компонентів поживних середовищ впливати не лише на рівень біосинтезу продукту, а й на його спрямованість у разі синтезу культурою багатокomпонентного цільового продукту.

В подальшому отримані дані будуть використані при оптимізації поживного середовища для біосинтезу як для даної культури продуценту, так і для актиноміцетів роду *Streptomyces*.

1. Лещинская И.Б. Современная промышленная микробиология // Соросовский обзорный журнал. – 2000. – 6, № 4. – С. 14–18.
2. K.S. Lam, “Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes”, Curr. Opin. Microbiol., no. 9, pp. 245–251, 2006.
3. Валагурова У.В., Козырицкая В.Е., Иутинская Г.А. Стрептомицеты рода *Streptomyces*. – К.: Наук. думка, 2003. – С. 234–260.
4. C.H. Ding et al., “High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86”, World J. Microbiol. and Biotechnol., vol. 20, no. 1, pp. 7–10, 2004.
5. 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.
6. 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.
7. Тодосійчук Т.С. Розробка технології гідролітичного ферментного препарату циторетицен: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. – К., 2000. – 25 с.
8. Сериновая протеиназа с литическими свойствами / И.Н. Павлова, Л.Г. Жолнер, И.Я. Захарова и др. // Микробиология. – 1988. – 57, № 3. – С. 398–404.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції
3 квітня 2012 року