

УДК 57.083.12/13:577.15.07

Л.М. Шинкаренко, Т.С. Тодосійчук,
Х. Хоккер**ДОСЛІДЖЕННЯ КОМПОНЕНТНОГО СКЛАДУ
І СПЕЦИФІЧНОСТІ ЛІТИЧНОГО ФЕРМЕНТНОГО
КОМПЛЕКСУ *STREPTOMYCES RECIFENSIS*
VAR. LYTICUS IMB Ac-5001****Вступ**

Широкі сфери практичного застосування літичних ферментів зумовлені їх здатністю до часткового або повного руйнування мікробних клітин. Серед основних напрямків їх використання: аналітичні дослідження будови мікробних клітин та отримання їх структур; застосування як основи антисептичних засобів (медичних, ветеринарних, миючих) та харчових консервантів; утилізація відходів та підвищення поживної цінності субстратів [1, 2].

Повідомлення щодо відкриття нових продуцентів лізоензимів та розробки промислових технологій з їх використанням, що надходять з провідних "біотехнологічних" країн світу, таких, як США, Японія, вказують на перспективність даного наукового напрямку і потребу у ферментних препаратах широкого спектра дії [3, 4]. Поряд з цим особливу актуальність робіт у цій галузі визначає обмежена кількість вітчизняних промислових продуцентів літичних ферментів, а тим більше, ефективних технологій цих препаратів.

Попередні дослідження культури актиноміцету *Streptomyces recifensis var. lyticus* IMB Ac-5001 дозволяють розглядати його як перспективний продуцент літичного ферментного комплексу широкого спектра дії [5, 6]. Вказаний штам було отримано методом індукованого мутагенезу із застосуванням N-метил-N-нігрозосечовини, що дозволило підвищити продуктивність вихідної культури в 1,5–2 рази. Стабільність вияву підвищеного рівня продуктивності штаму свідчило про генетичне закріплення набутої ознаки [7].

Постановка задачі

Потенційно широкі сфери застосування ферментного комплексу *Streptomyces recifensis var. lyticus* IMB Ac-5001 зумовлюють необхідність детального дослідження його компонентного складу та спектра дії. Встановлення індивідуальних

ферментів, що входять до комплексу, дасть змогу визначити найбільш перспективні галузі його практичного використання, а також слугуватиме науковим підґрунтям для розробки технології окремих ферментів комплексу. Дослідження спектра мікробних культур, що піддаються деградації літичним ферментним комплексом, є основною для визначення медичних напрямків його застосування.

Метою даного дослідження стало вивчення компонентного складу та специфічності окремих ферментів комплексу *Streptomyces recifensis var. lyticus* Ac-5001, визначення спектра його літичної активності по відношенню до широкого спектра мікробних збудників запальних процесів.

Матеріали і методи дослідження

Нами використовувалися препарати літичних ферментних комплексів CM, C, синтезовані селекціонованим продуцентом *Streptomyces recifensis var. lyticus* IMB Ac-5001 та вихідним штамом *Streptomyces recifensis var. lyticus* 2435 з активністю 300 тис. та 90 тис. од/г, відповідно.

Для визначення літичної активності (ЛА) ферментного препарату використовували тест-культуру *Lactobacillus delbrueckii*, а для визначення спектра літичної дії – модельні тест-культури. Тест-культури вирощували на м'ясопептонному агарі в чашках Петрі при 37 °С впродовж доби та використовували для визначення зон пригнічення росту або приготування клітинних суспензій для визначення ЛА.

Електрофоретичне дослідження компонентного складу ферментного комплексу проводили за стандартною методикою у вертикальному пластинчастому 15%-поліакриламідному гелі у трис-ОН буфері з рН 8,3 при додаванні 0,1% додецилсульфата натрія. Молекулярні маси компонентів комплексів визначали за їх електрофоретичною рухливістю, використовуючи такі маркери: α -лактальбумін (14,4 кД), Soybean Trypsin Inhibitor (20,1 кД), хімотрипсिन (25,0 кД), карбоангідраза (30,0 кД), овальбумін (43,0 кД), Bovine Serum Albumin (67,0 кД).

Фракціонування ферментного препарату проводили за стандартною методикою гель-фільтрації з такими параметрами процесу: матеріал – "Супердекс SF-75" (2000–70000 Д), швидкість потоку – 1 мл/хв, тиск – 0,33 МПа, буфер – рН 7,0 0,1 М (NH₄)₂HCO₃, об'єм фракцій – 5 мл. Сусідні фракції об'єднували за концентрацією білка. Приготування зразка: 250 мг ферментно-

го препарат
фугували
користову
дину.

ЛА ф
здатністю
ражали у
білка. За
що знижу
тури на
при розв
суспензії
бідиметри

Прот
ністю до
субстрат
ному буф
ка [9]. Бі
ури [10].

Резу.

В е
ментні пр
тивувани
штамів S
CM, відп
діалізу п
електроф
стому гел

Резу.
новити н
лекулярн
новому

го препарату розчиняли у 2 мл буферу, центрифугували при 12 тис. об/хв, відділяли осад та використовували для дослідження надосадкову рідину.

ЛА ферментного комплексу визначали за здатністю до лізису суспензій тест-культур і виражали у відсотках їх деградації та в од/мкг білка. За одиницю ЛА брали кількість ферменту, що знижує оптичну густину суспензії тест-культури на 0,001 за 1 хв в 1 мл реакційної суміші при розведенні ферменту, що забезпечує лізис суспензії на 25–30%. Визначення проводили турбідиметричним методом [8].

Протеолітичну активність визначали за здатністю до гідролізу казеїну, використовуючи як субстрат 1%-й розчин казеїну в 0,1 М фосфатному буфері з рН 7,6 і виражали в од/мкг білка [9]. Білок у пробах визначали за методом Лоруї [10].

Результати дослідження і їх обговорення

В експерименті використовували ферментні препарати, що були отримані при культивуванні вихідного та селекціонованого штамів *Streptomyces recifensis var. lyticus* – С і СМ, відповідно. Попередньо очищені методом діалізу препарати розділяли за допомогою електрофорезу у поліакриламідному пластинчастому гелі.

Результати дослідів (рис. 1) дозволили встановити наявність у комплексах 12 білків з молекулярними масами від 16 до 60 кД, що в основному підтверджується даними літератури що-

до вивчення ферментного комплексу вихідного штаму [11].

З наведених даних видно, що відсотковий вміст окремих білкових компонентів комплексів неоднаковий. Так, майже 90% становлять фракції з молекулярними масами близько 18–30 та 43–50 кД – вірогідно, гексозамінідази та ендопептидази [12].

Порівнюючи отримані електрофореграми ферментних комплексів вихідного та селекціонованого штамів, можна відзначити певні відмінності.

Поряд з однаковим компонентним складом комплексів відчутний перерозподіл їх відсоткового вмісту. Так, у комплексі СМ виявляється вищий вміст білків з молекулярними масами близько 18 і 22 кД відносно вихідного штаму та одночасне зниження відсотка компонента масою 58–60 кД. Це, очевидно, є результатом дії мутагену, що застосовувався в селекції.

Аналізуючи дані літератури [11–13], можна припустити, що мутагенізація призвела до підвищення біосинтезу ферменту із специфічністю N-ацетил-мурамідози. Цей фермент, виявлений у багатьох представників р. *Streptomyces*, має високу стафілолітичну активність, руйнуючи β -1,4-N-ацетилмурамільні та β -1,4-N-6-O-діацетилмурамільні зв'язки у пептидоглікан (ПГ) клітинної стінки *St. aureus*. Зроблені припущення дозволяють зробити і наведені в літературі характеристики ідентифікованих мурамідаз і насамперед їх молекулярні маси: мурамідози *S. griseus*, *S. globisporus*, *S. rutgersensis* мають

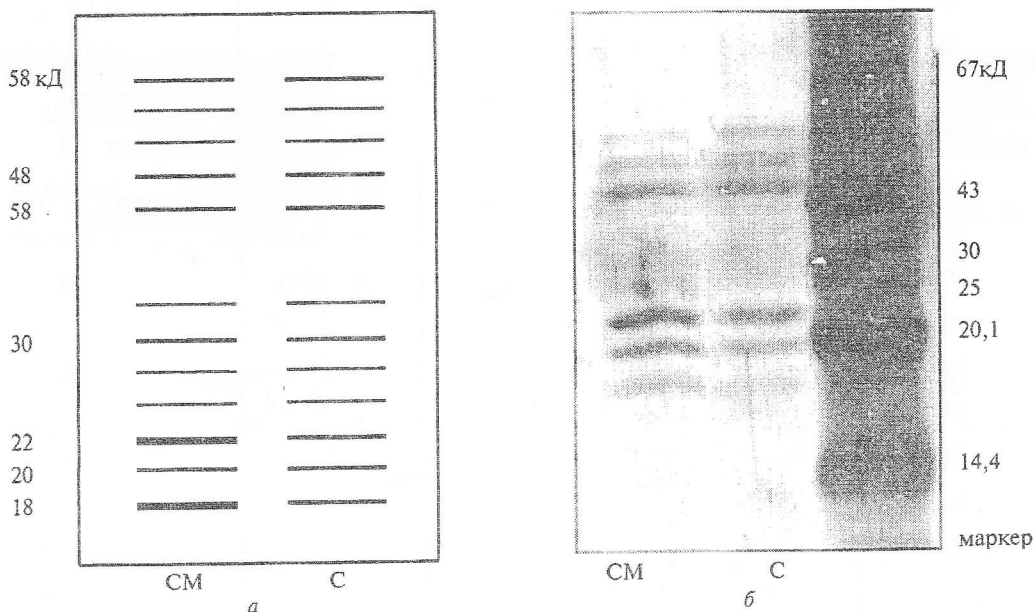


Рис. 1. Електрофореграма ферментних комплексів вихідного (С) та селекціонованого (СМ) продуцентів: а – інтерпретація результатів; б – фото

молекулярні маси 22, 20, 22 кД, відповідно, та високу стафілолітичну активність [14, 15].

Для розділення ферментного комплексу та характеристики специфічності окремих його фракцій використовували гель-фільтрацію на "Супердекс SF-75" та електрофоретичне встановлення молекулярних мас білка в окремих фракціях. Результати експерименту наведені в таблиці.

Фракції № 12–22 використовували для визначення протеолітичної та літичної активності ферментів (див. таблицю). З наведених даних видно, що максимальною протеолітичною активністю характеризуються білки ферментного комплексу з молекулярними масами 20, 24–31 кД, які, очевидно, є гексозамінідазами. Літична активність максимально виражена у фракціях комплексу, що відповідає білковим молекулам з молекулярною масою 20 кД (ймовірно, мурамідази).

Отримані результати можна використовувати при розробці технологій ензимів певної специфічності. Так, для отримання препарату протеїназ необхідно виділити фракції ферментного комплексу з молекулярними масами 24–31 кД. Препарат літичного спрямування має містити ензими комплексу з молекулярною масою 20 кД (фракції 17–20).

Для встановлення можливості використання досліджуваного ферментного комплексу в складі медичних засобів визначали спектр літичної (протимікробної) дії. Формування модельного спектра культур здійснювали із врахуванням характеристик окремих патогенів, ступенем їх поширення та наявністю засобів по боротьбі з ними [16]. Добові тест-культури суспендували в 0,01 М фосфатних буферах з рН 5,0 і 7,0 та піддавали дії ферментного препарату в концентрації 100 од/мл суміші при 37 і 50 °С протягом 30 хв.

Таблиця. Дослідження фракційного складу і специфічної активності окремих фракцій ферментного комплексу *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* IMB Ac-5001

| № фракції | Об'єм фракції, мл | Концентрація білка, мкг/мл | Молекулярна маса білка, кД | ЛА, од/мкг білка | Протеолітична активність, од/мкг білка |
|-----------|-------------------|----------------------------|----------------------------|------------------|--|
| 1–9 | по 300 | 0 | – | – | – |
| 10 | 300 | 51,65 | 64 | – | – |
| 11 | 300 | 78,08 | 62 | – | – |
| 12 | 300 | 196,13 | 36 | 0 | 0 |
| 13 | 300 | 255,92 | 31 | 0 | 0 |
| 14 | 300 | 453,50 | 31 | 0 | 4,5 ± 0,23 |
| 15 | 300 | 418,12 | 24 | 0 | 4,9 ± 0,20 |
| 16 | 300 | 196,30 | 24 | 0 | 0 |
| 17 | 300 | 284,69 | 20 | 1,5 ± 0,02 | 0 |
| 18 | 300 | 587,80 | 20 | 6,5 ± 0,20 | 5,0 ± 0,25 |
| 19 | 300 | 216,10 | 20 | 5,8 ± 0,25 | 4,8 ± 0,19 |
| 20 | 300 | 78,28 | 20 | 5,4 ± 0,25 | 0 |
| 21 | 300 | 37,13 | – | 0 | 0 |
| 22 | 300 | 24,90 | – | 0 | 0 |
| 23 | 300 | 14,25 | – | – | – |
| 24 | 300 | 14,72 | – | – | – |
| 25 | 300 | 22,36 | – | – | – |
| 26 | 300 | 8,01 | – | – | – |
| 27, 28 | по 300 | 0 | – | – | – |

Резу
(рис. 2) д
ваних фак
а також р
від ефект

Отри
препарат
вищий, н
нізмів на
немає, ш
ми будов
культур.

Найв
дації) від
філококу
цента сам
вищий рі
рівняно з
всіх дослі

Зниж

рату по ві
(порівнян
явністю к
reus ще й
незважаю
препарату
них умова
сокою –
досліджен
(37 °С, рН
кільки стр
а *V. cereu*



100 80

Рис. 2

Результати проведеного експерименту (рис. 2) дозволяють встановити вплив досліджуваних факторів на процес деградації клітин (в %), а також розділити культури на групи залежно від ефективності дії препарату.

Отримані дані свідчать, що рівень лізису препаратом грампозитивних бактерій у цілому вищий, ніж клітин грамнегативних мікроорганізмів на 10–30%. Однак чіткої закономірності немає, що, ймовірно, пов'язано з особливостями будови клітинної стінки використаних тест-культур.

Найвища активність препарату (90% деградації) відзначена по відношенню до клітин стафілококу, очевидно, внаслідок відбору продуцента саме за стафілолітичною здатністю. Найвищий рівень деградації клітин стафілококу порівняно з іншими культурами зберігається при всіх досліджених режимах інкубації.

Зниження активності ферментного препарату по відношенню до *Str. thermophilus* і *B. cereus* (порівняно із стафілолітичною) пояснюється наявністю капсул у цих мікроорганізмів, а у *B. cereus* ще й здатністю до споруутворення. Однак, незважаючи на відзначене зниження активності препарату відносно цих культур, при оптимальних умовах (50°C, рН 7,0) вона залишається високою – 75–83% деградації клітин і при всіх досліджених режимах не падає нижче 43–62% (37°C, рН 5,0). Це має важливе значення, оскільки стрептококова інфекція дуже поширена, а *B. cereus* – умовно патогенний мікроорганізм,

що за будовою клітинної стінки є аналогом *B. anthracis* (збудника сибірки).

Загальне зниження активності препарату по відношенню до грамнегативних бактерій пояснюється особливістю будови їх клітинних стінок та наявністю додаткової зовнішньої мембрани на їх поверхні, до складу якої входять фосфоліпіди, полісахариди – речовини, що не гідролізують ферменти комплексу.

Близький рівень бактеріолітичної активності виявляється при дії досліджуваної дози препарату на клітини *Ps. aeruginosa*, *E. coli*, *Pr. rettgeri* – 58–73% при 50°C, рН 7,0. Дані культури не мають значних відмінностей у будові клітинної стінки, а також можуть розглядатися як типові представники грамнегативних мікроорганізмів. Тому активність ферментного препарату по відношенню до цих культур, вірогідно, може вважатися характерною і для інших грамнегативних бактерій, що не мають додаткових структурних включень в оболонці.

Аналіз отриманих даних дозволяє встановити, що зниження температури інкубації від оптимальної до 37°C в цілому є більш суттєвим фактором ефективності досліджуваного препарату, ніж зміна рН з 7,0 до 5,0. Так, при зниженні температури стафілолітична активність зберігається на 84% (90 і 76% деградації, відповідно), а при зміні рН виявляється 89% активності від максимальної (90 і 80% деградації, відповідно). Однак різниця коливається лише в межах 5% і для інших культур чіткої закономірності немає.

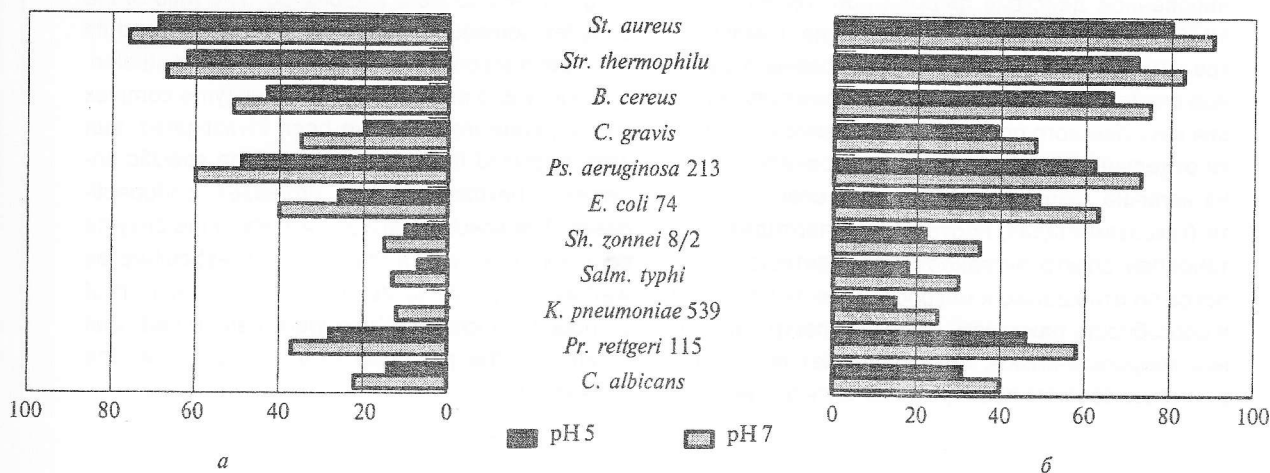


Рис. 2. Спектр літичної активності ферментного комплексу залежно від умов інкубації реакційної суміші: а – при 37°C; б – при 50°C

Висновки

1. Визначені молекулярні маси основних компонентів літичного ферментного комплексу знаходяться в межах 18–60 кД.

2. Аналіз складу ферментного комплексу мутантного штаму порівняно з батьківським виявив відносно збільшення низькомолекулярних компонентів (18–22 кД), що можуть бути віднесені до мурамідаз. Вказаний перерозподіл вмісту окремих ферментів у складі комплексу внаслідок дії N-метил-N-нітрозосечовини, очевидно, й зумовив підвищення його загальної активності.

3. Визначені компоненти ферментного комплексу із встановленими специфічностями зумовлюють наявність протеолітичної (24–31 кД) та літичної (20–24 кД) активності препарату.

4. Найвища літична активність ферментного комплексу селекціонованого продуцента від-

значена по відношенню до культур *Ps. aeruginosa*, *E. coli*, *Pr. rettgeri*, що належать до найбільш поширених збудників запальних процесів.

5. Встановлений температурний (37–50°C) і рН (5,0–7,0) діапазон літичної активності ферментного комплексу поряд із здатністю до деградації широкого спектра клітин патогенних мікроорганізмів зумовлює можливість застосування ферментного препарату в складі антисептичних медичних та миючих засобів.

6. Проведені дослідження є етапом на шляху до подальшої розробки технології отримання літичного ферментного препарату широкого спектра дії.

* * *

Дослідження проводилося в рамках виконання проектів, що фінансуються Міністерством освіти і науки України.

Л.Н. Шинкаренко, Т.С. Тодосійчук, Х. Хоккер

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА И СПЕЦИФИЧНОСТИ ЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА *STREPTOMYCES RECIFENSIS* VAR. *LYTICUS* IMB Ac-5001

Проведено определение характеристик литического ферментного комплекса и спектра его действия. Исследован компонентный состав ферментного комплекса и установлены молекулярные массы отдельных энзимов, обеспечивающих комбинированное действие ферментного препарата – 18–60 кД. Установлено соотношение компонентов комплекса, получены и исследованы отдельные его фракции. Определена специфичность действия комплексного препарата и ведущие активности отдельных фракций, которые проанализированы на наличие энзимов определенной специфичности (гексозаминидаз, протеаз, эндопептидаз). Установлен спектр активности ферментного комплекса по отношению к микробным тест-культурам и способность разрушать широкий спектр патогенных микроорганизмов, что определяет перспективы использования препарата как антисептика.

L.M. Shynkarenko, T.S. Todosiychuk, H. Hoecker

INVESTIGATION OF THE COMPONENT COMPOSITION AND SPECIFICITY OF THE LYTIC ENZYME COMPLEX FROM *STREPTOMYCES RECIFENSIS* VAR. *LYTICUS* IMB AC-5001

The characteristics of lythic enzyme complex and its spectrum of action were studied. The component composition of the enzyme complex was investigated. The molecular weight of individual enzymes, that provide the combined action of the enzyme drug – 18–60 kD were established. The ratio of the complex compounds has been established and its separate fractions have been obtained and studied. Specificity and main activity of the enzyme complex and separate fraction have been investigated, that were analyzed for the presence of the specific enzymes – hexosaminidases, proteases, endopeptidases. The spectrum of lythic activity of the enzyme complex in respect of the microbial test-culture as well as the ability to destroy a wide spectrum of pathogenic microorganisms were established, that determines the prospects of the drug use as the antiseptic means.

1. Кулаев И.С. Бактериолитические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 3. – С. 23–31.

2. Бабенко Ю.С. Перспективы получения и практического применения литических ферментов // Биологические науки. – 1985. – № 12. – С. 64–67.

3. Senba
on and
se from
and B
4. Tirum
racteri
rosolve
27, №
5. Todosi
перськ
на бан
су з S
ві віст
6. Шинк
біосуб
ного п
Експр
1998.
7. Todosi
сілія J
lyticus
робиол
8. Павло
новая
робиол
9. Пепро
олити

Рекон
техно

3. Senba M., Kashige N., Miake F., Watanabe K. Purification and properties of the three β -N-acetylglucosaminidase from *L. casei* ATCC 27-092 // Biosci., Biotechnol. and Biochem. – 1998. – 62, № 2. – P. 404–406.
4. Tirumale S., Guttapadu S., Krishna N. Purification and characterization of β -1,4-glucosidase from *Clostridium papyrosolvans* // Biotechnol. and Appl. Biochem. – 1998. – 27, № 2. – P. 175–179.
5. Тодосійчук Т.С., Жолнер Л.Г., Шинкаренко Л.М., Касперський В.О. Вплив наповнювачів лікарських форм на бактеріолітичну активність ферментного комплексу з *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435/М // Наукові вісті НТУУ “КПІ”. – 1998. – № 1. – С. 141–145.
6. Шинкаренко Л.М., Жолнер Л.Г., Тодосійчук Т.С. Вплив біосубстанцій макроорганізму на активність ферментного препарату з *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435/М // Експрес-новини: наука, техніка, виробництво. – 1998. – № 3–4. – С. 48.
7. 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.
8. Павлова И.Н., Жолнер Л.Г., Захарова И.Я. и др. Сериновая протеиназа с литическими свойствами // Микробиология. – 1988. – 57, № 3. – С. 398–404.
9. Петрова И.С., Винцонайте М.Н. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения // Прикл. биохимия и микробиология. – 1966. – 2, № 2. – С. 322–327.
10. Lowry O.H., Resebrought N.L., Farr A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, № 1. – P. 265–276.
11. Литические ферменты штамма *Actinomyces recifensis* var. *lyticus* 2435, их получение и свойства / Ю.С. Бабенко, Т.П. Килочек, И.Е. Соколова, Т.Я. Куликова. – Днепропетровск: Днепропетр. ун-т, 1988. – 9 с. – Рус. – Деп. в ВИНТИ, 26.05.88, № 4121–В88.
12. Соколова И.Е. Выделение и изучение бактериолитического ферментного комплекса *Actinomyces recifensis* var. *lyticus* 2435: Автореф. дис... канд. биол. наук. – М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 1986. – 17 с.
13. Захарова И.Я., Павлова И.Н. Литические ферменты микроорганизмов. – К.: Наук. думка, 1985. – 216 с.
14. Yokogawa K., Kawata S., Yoshimura Y. Purification and properties of a lytic enzyme from *Streptomyces griseus* H-402 // Agr. and Biol. Chem. – 1976. – 40, № 4. – P. 661–667.
15. Yokogawa K., Kawata S., Takemura T., Yoshimura Y. Purification and properties of lytic enzymes from *Streptomyces globisporus* 1829 // Ibid. – 1975. – 39, № 8 – P. 1533–1543.
16. Jacoby George A. Antimicrobial-resistant pathogens in the 1990s // Annu. Rev. Med.: Select. Top. Clin. Sci. – 1996. – 47. – P. 169–179.

Рекомендована Радою факультету біотехнології і біотехніки НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції
19 липня 2004 року