

ДИНАМІКА ВПЛИВУ ІОНІВ ДЕЯКИХ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА БІОСИНТЕТИЧНУ СПРОМОЖНІСТЬ ШТАМУ *STREPTOMYCES RECEFENSIS* VAR. *LYTICUS* 2P-15 В ПЛАНІ СИНТЕЗУ АМІЛОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ

Є.М. ІВЧЕНКО,

аспірантка кафедри біотехнології та БЖД 3 року навчання

за спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія,

<https://orcid.org/0009-0000-8880-8650>,

ivchenko_ym@czvfn.dnu.edu.ua

Н.Б. МІТІНА,

кандидат технічних наук, доцент, завідувач кафедри біотехнології

та безпеки життєдіяльності,

<https://orcid.org/0000-0002-5384-7040>

Український державний хіміко-технологічний університет,

м. Дніпро, Україна

Анотація. Сучасна біотехнологія ензимів є перспективною та швидко розвиваючою галуззю промислової біотехнології, яка потребує нових перспективних досліджень в аспекті оптимізації умов біосинтезу ферментів. Модулювання біосинтетичної активності штамів продуцентів дозволяє значно збільшити економічний вихід виробництва. Найважливішими з факторів збільшення ефективності є склад поживного середовища, яке може бути оптимізоване залежно від потреб мікроорганізмів. В рамках комплексного дослідження оптимізації складу живильного середовища симплекс-методом математичного моделювання метою роботи є дослідження впливу іонів деяких важких металів на біосинтетичну спроможність штаму *Streptomyces recefensis* var. *lyticus* 2P-15. Досліджено вплив іонів деяких важких металів на біосинтетичну спроможність штаму *Streptomyces recefensis* var. *lyticus* 2P-15 в плані синтезу амілолітичних ферментів, накопичення біомаси та білку. Об'єкт дослідження – штам *Streptomyces recefensis* var. *lyticus* 2P-15, одержаний трьох ступінчатою селекцією продуценту. Для виконання досліджень було застосовано симплекс-метод добору складу середовища. Для аналізу біосинтетичної активності використовували стандартні методи визначення біомаси та амілолітичної

активності. Встановлено, при додаванні іонів Co, Mo, Cd в концентрації 0,00001 та 0,0005 мг/мл пригнічує ріст біомаси, але підвищує вміст білку на 13-57% відповідно. Визначено, що додавання іонів Co, Mo, Cd в різних концентраціях сприяє підвищенню як кількісного так і якісного складу синтезованих ензимів і в найкращому відгуку мало місце підвищення амілолітичної активності на 354% до контролю. Перспективою подальших досліджень оптимізації біосинтезу актиноміцетів симплекс- методом інших аспектів його регуляції буде підвищувати біосинтетичну спроможність досліджуваного штаму, що буде позитивно впливати економічний вихід виробництва амілолітичних ферментних препаратів шляхом отримання мікробного синтезу

Ключові слова: амілолітичні ферменти, біосинтетична спроможність, математичне моделювання, іони важких металів, поживне середовище.

Вступ.

В останній час значно зріс інтерес до літичних ферментів, які володіють спроможністю в м'яких умовах гідролізувати специфічні зв'язки клітинних стінок мікроорганізмів, що призводить до дезінтеграції клітин. Ферменти, що володіють цими властивостями, широко використовують на практиці, наукових дослідженнях при вивченні тонкої будови клітинних стінок бактерій та дріжджів, виділенні внутрішньоклітинних органел, окремих макромолекул (хромосомної та не хромосомної ДНК). Важливого значення набуло використання літичних ферментів для отримання протопластів, які використовуються в клітинній інженерії. Однак відсутність дешевих джерел цих ферментів не дозволяє налагодити їх широкомасштабну промисловість та використання на практиці. Тому велика увага приділяється підвищенню ефективності мікробіологічних виробництв за рахунок вирішення проблеми підвищення життєдіяльності продуцентів і розробки прийомів інтенсифікації їх росту та продуктивності (Pyrog T.P. et al., 2020; Paul J.S. et al., 2017).

Одним з таких регуляторів продуктивності штаму можна вважати важкі метали, які неоднаково впливають на синтез і активність ферментів, а саме лізоензимів. Штам *Streptomyces rechefensis* var. *lyticus* 2P-15 синтезує складний комплекс бактеріолізинів та стимуляторів росту на середовищі до складу входить також набір іонів металів, які, як відомо, виступають в якості індукторів процесів синтезу різних груп ензимів. Взаємодія важких металів з клітинами мікроорганізмів виявляє інтерес щодо практичних задач і з теоретичної точки зору. Відомо, що деякі метали залежно від концентрації можуть позитивно або негативно впливати на здатність стрептоміцетів утворювати біологічно активні речовини. Для росту мікроорганізмів і біосинтезу ряду біологічно активних речовин важливе значення має склад живильного середовища. Продуценти літичних та інших ферментів здатні рости на різних середовищах, в тому числі і на синтетичних. Поряд з іншими компонентами суттєву роль у життєдіяльності мікроорганізмів грають мікроелементи (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, Co та інші). Вони входять до складу ряду ферментів, що прийма-

ють участь в процесах метаболізму. Ці елементи мають високу каталітичну активність у процесі внутрішньоклітинного обміну (Pyrog T.P. et al., 2020).

Узагальнюючи існуючі літературні дані, слід зазначити, що варіанти дії важких металів на різні організми вельми різноманітні, а число досліджених об'єктів дуже мале. Розширення кола об'єктів в кожній фізіологічній групі мікроорганізмів в сполученні з застосуванням комплексу підходу зробить можливим подальший розвиток уявлень в цій галузі та дозволить вирішити практичні задачі, що пов'язані з дією важких металів на мікроорганізми.

Матеріали та методи дослідження.

Амілолітичні ферменти мікробного походження відносяться до індукцбельних, тобто їх синтез залежить від різних умов культивування та складу живильного середовища. Штам *Streptomyces recefensis* var. *lyticus* 2P-15 – продуцент складного комплексу бактеріологічних, дріжджолітичних та інших екстрацелюлярних ферментів та стимуляторів росту глікопротеїнової природи. До складу його метаболітів входять амілази, глікозидази, літичні ендопептидази, мурамідози, протеази (Shynkarenko L.M. et al., 1998).

Штам *Streptomyces recefensis* var. *lyticus* 2P-15 в процесі культивування на рідких живильних середовищах накопичує комплекс гідролітичних ферментів в культуральній рідині. Глибинне вирощування вказаного продуцента з метою отримання амілолітичних ферментів проводили в колбах ємністю 250 мл, які містили по 100 мл середовища на качалках

(220 об./хв) протягом 72 годин при 28°C. Маточне середовище було наступного складу (на 100 мл): соєве борошно – 0,48%, CaCl₂ – 0,1%, CaCO₃ – 0,2%, H₂O(дист.), NH₄NO₃ – 0,075%, K₂HPO₄ – 0,01%, крохмаль – 4,0%, та композицію іонів металів, які як відомо, виступають в якості індукторів процесів синтезу різних груп ензимів (Shynkarenko L.M. et al., 1998; Gregirchak N.M. et al., 2015).

Для досягнення поставленої мети використовували ферментативне середовище наступного складу (на 50 мл): соєве борошно – 0,6%, глюкоза – 1,1%, кукурудзяний екстракт – 1%, глутамат натрію C₅H₈NO₄Na•H₂O – 0,5%, NH₄NO₃ – 0,15%, K₂HPO₄ – 0,027%, CaCl₂ – 0,2%, CaCO₃ – 0,42%, H₂O(дист.), FeSO₄•7H₂O – 0,005%, MnCl₂•H₂O – 0,0015%, MgCl₂•6H₂O – 0,056%, ZnSO₄•H₂O – 0,2•10⁻⁴%. Накопичення амілолітичних ферментів проводили в колбах ємністю 250 мл на качалках (220 об./хв) протягом 72 годин за температури 28 °C (Shynkarenko L.M. et al., 1998). Для оптимізації системи культивування використовували метод симплексу (Chervakov O.V. et al., 2016).

Матриця дослідів вихідного симплекса в кодованих змінних наведена в табл. 1. Символом «0» позначені координати центра плану, тобто основний рівень.

Величини, що входять у цю таблицю, розраховуються за такими формулами:

$$k_i = \sqrt{\frac{1}{2i(i+1)}}$$

i – номер фактора в матриці планування. Досліди, надані в табл.1, відповідають вершинам симплекса, сторона якого дорівнює одиниці, а

1. Матриця вихідного симплексу

Номер досліджу	X ₁	X ₂	...	X _{n-1}	X _n	Функція відгуку
1	k ₁	k ₂	...	k _{n-1}	k _n	y ₂
2	-R ₁	k ₂	...	k _{n-1}	k _n	y ₂
3	0	-R ₂	...	k _{n-1}	k _n	y ₂
...	...	...	...	...	...	...
n-1	0	0	...	k _{n-1}	k _n	y _{n-1}
n	0	0	...	R _{n-1}	k _n	y _n
n+1	0	0	...	0	-R _n	y _{n+1}

центр збігається з початком координат (в кодованих змінних) (Chervakov O.V. et al., 2016).

Для визначення біосинтетичної спроможності штаму *Streptomyces recefensis* var. *lyticus* 2P-15 за оптимальних концентрацій іонів металів було проведено фракціонування на сефадексі G-100 (колонка 16 см, кількість білку, який наносився - 10 мг). Елюція здійснювалась 0,02 М Na-ацетатним буфером, рН- 5,4; швидкість елюції - 12 мл/год).

Визначення біомаси проводили вагомим методом. Міцелій відфільтрований та відмитий 5%-вим розчином ТХО та водою, висушують при 105°C до постійної ваги та виражають у мг/мл середовища та визначається за формулою:

$$M = \frac{A-B}{V}, \text{ де}$$

M - суха біомаса, мг/мл

A - маса фільтру з біомасою, мг

B – маса фільтру без біомаси, мг

V – кількість культуральної рідини, взятої для фільтрування, мл

Біосинтетична спроможність штаму *Streptomyces recefensis* var. *lyticus* 2P-15 виражається у продуктивності штаму. Продуктивність розраховується за формулою:

$$П = \frac{AO}{M}$$

де АО – амілолітична продуктивність, АО/мл;

M- суха біомаса, мг/мл;

Визначення амілолітичної активності здійснювали за стандартною методикою (Paul J.S. et al., 2017) з використанням фотоелектроколориметра (КФМ-2МП). За одиницю амілолітичної активності АЕ приймали кількість ферменту, яка за температури 37 °С протягом 30 хвилин розщеплює 10 мг крохмалю. Амілолітичну активність визначали за формулою:

$$AE/мл = \frac{(Дконтр - Ддослід) \cdot 60 \cdot \text{розведення}}{Ддослід \cdot 10}$$

де Дконтр – оптична щільність проби з пробірки В;

Ддослід – оптична щільність проби з пробірки А;

Одержані результати обробляли методами математичної статистики, достовірними вважали відмінності при P<0,05. Усі дослід виконували в 3-х повторюваннях. Розрахунок усіх показників та побудову графіків, гістограм проводили з використанням програмного забезпечення Microsoft Office Excel (США).

2. Вплив йонів важких металів на накопичення біомаси та вміст білку штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15

Йони металів, що додаються до ферментативного середовища	Біомаса, мг/мл $\pm m$ % до К		Білок, мг/мл $\pm m$ % до К	
	мг/мл $\pm m$	% до К	мг/мл $\pm m$	% до К
Контроль (без додавання металів)	6,00 $\pm$ 0,12	100	0,75 $\pm$ 0,014	100
Co 0,00001	4,50 $\pm$ 0,09	75	0,91 $\pm$ 0,018	121
Co 0,0005	4,10 $\pm$ 0,08	68	0,88 $\pm$ 0,016	117
Co 0,001	3,80 $\pm$ 0,04	63	0,86 $\pm$ 0,015	113
Mo 0,00001	5,30 $\pm$ 0,11	88	1,18 $\pm$ 0,029	157
Mo 0,0005	5,00 $\pm$ 0,10	83	1,06 $\pm$ 0,027	141
Mo 0,001	5,20 $\pm$ 0,11	86	1,01 $\pm$ 0,025	134
Cd 0,00001	5,80 $\pm$ 0,11	96	1,03 $\pm$ 0,025	137
Cd 0,0005	5,30 $\pm$ 0,09	88	0,65 $\pm$ 0,011	86
Cd 0,001	5,00 $\pm$ 0,10	83	0,31 $\pm$ 0,009	41

Результати та їх обговорення

Досліджено вплив іонів деяких важких металів (кобальту, молібдену, кадмію) які додавались до ферментаційного середовища. В результаті експерименту дослідили накопичення біомаси, білку та амілолітичної активності

Як видно з таблиці 2 внесення кобальту, молібдену та кадмію в різних концентраціях по різному впливає на приріст біомаси та накопичення білку.

Як видно з таблиці 2 рівень накопичення біомаси суттєво зменшується при наявності в розчинах іонів важких металів в будь-яких концентраціях.

Так, найменша кількість спостерігається при внесенні кобальту в концентрації 0,001 мг/мл, що знижує накопичення біомаси майже вдвічі, порівняно з контролем. Однак, у більш низьких концентраціях кобальту (0,0005 та 0,00001 мг/мл) прослідковується накопичення біомаси до

68-75% від контролю. Тому можна зробити припущення, що, можливо, при внесенні 0,00001 мг/мл кобальту до рідкого середовища енергія катаболізму починає витрачатися на біосинтез сполук білкової природи. Бо саме при цій концентрації спостерігається високий вміст білку. Кадмій також у низьких концентраціях стимулює до підвищення накопичення біомаси порівняно з іншими металами. Таким чином, у концентрації 0,00001 мг/мл накопичення біомаси становить 96% від контролю, де рівень біомаси найвищий. В контролі наявна невелика кількість білку, а при внесенні 0,00001 мг/мл молібдену - його найбільший відсоток - 157%. Найменша кількість білку при концентрації 0,001 мг/мл кадмію, що доводить її пригнічуючий ефект.

Досліджено вплив важких металів на прояв амілолітичної активності вказаного штаму. При внесенні до середовища іонів важких металів дещо підвищується синтез амілолітичних ферментів, порівняно з контролем.

3. Вплив іонів важких металів на амілолітичну активність штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2p-15

Концентрація іонів металів, мг/мл	Амілолітична активність АО/мл	
	АО/мл, $\bar{X} \pm m$	% до контролю
Контроль (без додавання металів)	24,0 $\pm$ 1,5	100
Co 0,00001	21,4 $\pm$ 1,2	89
Co 0,0005	61,0 $\pm$ 2,8	254
Co 0,001	55,07 $\pm$ 2,49	229
Mo 0,00001	17,46 $\pm$ 1,8	72
Mo 0,0005	85,05 $\pm$ 4,1	354
Mo 0,001	65,62 $\pm$ 2,9	273
Cd 0,00001	23,29 $\pm$ 1,4	97
Cd 0,0005	25,53 $\pm$ 1,7	106
Cd 0,001	24,94 $\pm$ 1,6	103

Слід зазначити, що більш низькі концентрації металів (0,00001 мг/мл) у всіх випадках в деякій мірі знижують вихід амілаз до середовища. Так, при внесенні 0,00001 мг/мл молібдену до ферментаційного середовища спостерігається зменшення амілолітичної активності на 28% порівняно з контролем. При внесенні більш високих концентрацій, що становлять 0,001 мг/мл спостерігається різке підвищення синтезу амілолітичних ферментів. Наприклад, внесення кобальту та молібдену у вказаних концентраціях призводить до підвищення виходу амілаз до середовища до 55,07 та 65,62 од/мл відповідно, що майже вдвічі перевищує контроль (24,0 од/мл). Оптимальною являється концентрація 0,0005 мг/мл, при внесенні якої до середовища у всіх випадках, спостерігається значне підвищення синтезу амілолітичних ферментів. Так, при внесенні кобальту у вказаній концентрації спостерігається підвищення виходу амілаз до середовища до 229%, порівняно з контролем, молібдену - до 354%, що

є найвищим показником. Кадмій у вивчених концентраціях не викликає значних змін у синтезі амілолітичних ферментів, так як одержані дані близькі до показників контролю, але з підвищенням концентрації підвищуються і вихід амілаз до середовища. Як було сказано вище, досліджуваний лізоензимний препарат собою складний комплекс різних груп ферментів. Для того, щоб виявити гетерогенність ферментного комплексу культуральної рідини штаму вирощеного з додаванням до рідкого середовища іонів молібдену та кадмію в концентрації 0,0005 та 0,001 мг/мл відповідно, було проведено розділення ферментів на сефадексі G-100. Нумерація білкових компонентів проводилася по кількості фракцій, отриманих наприкінці фракціонування. На рисунку 1 зображено дані дослідження контрольної проби після фракціонування на сефадексі G-100 (колонка 16 см, кількість білку, який наносився - 10 мг). Елюція здійснювалась 0,02 М Na-ацетатним буфером, рН- 5,4; швидкість елюції - 12

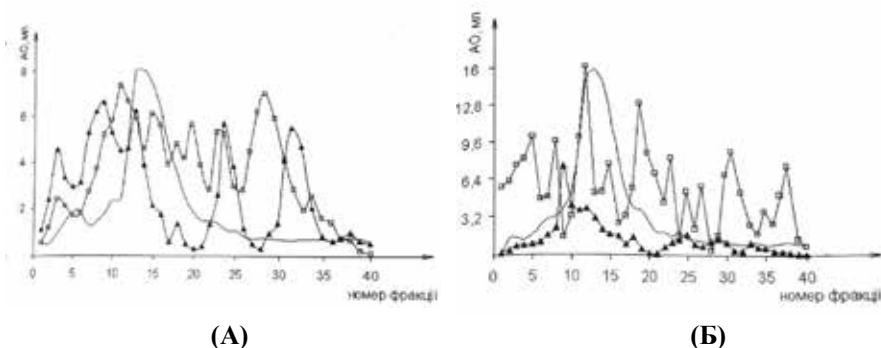


Рис. 1 Гель-фільтрація на сефадексі G-100 ферментного комплексу без додавання іонів металів (А) Гель-фільтрація на сефадексі G-100 ферментного комплексу з додаванням іонів Молибдену (Б)

мл/год). Отримані фракції досліджувались на біосинтетичну спроможність штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15.

В якості прикладу дослідження впливу іонів важких металів на амілолітичну активність штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2p-15 на рисунку представлено результати з найкращим відгуком гель-фільтрації з додаванням іонів Молибдену

Проаналізувавши результати, що представлені на рисунку 1,2 видно, що з додаванням іонів Молибдену утворюється 11 піків, на відміну від контролю, який утворює 8 піків. Піки 1,2,3,4,5,6,9 та 11 високоактивні. Їх активність коливається від 7,393 до 15,94 мл, що в 2 рази перевищує значення контролю. Високоактивні піки займають 11 фракцій, тоді як в контролі 14 фракцій. Піки 7,8 та 10 являються малоактивними, активність яких становить 3,589-5,798 мл вони займають 6 фракцій. Отже, вихід активних амілаз спостерігається в 17 фракціях. Таким чином, вихід амілолітичних ферментів відбувається вже з перших фракцій і триває до кінця елюції. Крім того, зберігається обер-

нено-пропорційна залежність виходу білка і амілолітичних ферментів, хоча й дещо зміщена на 2-3 фракції. Максимальне значення виходу амілаз спостерігається вже в 12 фракції і становить 15,94 мл, що вдвічі менше максимуму контрольної проби, яке спостерігається в 11 фракції. Найнижче значення має 28 фракція (0,439 мл), тоді як в контрольній пробі мінімальне значення амілолітичної активності має 40 фракція (0,113 мл). Отже, молибден у вказаній концентрації сприяє різкому підвищенню синтезу індивідуальних ферментів.

Висновки.

Експериментальні дані показали, що іони важких металів по-різному впливають і на біосинтетичну спроможність штаму. Визначені як оптимальні, так і пригнічуючи концентрації металів. Встановлено, що додавання іонів важких металів в різних концентраціях сприяє підвищенню, як кількісного так і якісного складу синтезованих ензимів. Одержані результати мають як теоретичне, так і практичне значення і можуть

сприяти одержанню біопрепаратів з певними властивостями.

References

1. Pyrog T.P., Penchuk Yu.M. Biochemical basics of microbial synthesis: textbook - K.: Lira-K Publishing House, 2020. - 258 p.
2. J.S. Paul, B.M. Lall b, S.K. Jadhav, Parameter's optimization and kinetics study of α -amylase enzyme of *Bacillus* sp. MB6 isolated from vegetable waste Process Biochemistry Vol. 52, January 2017, Pages 123-129 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.10.005>
3. S.P. Saha, S. Ghosh, D. Mazumdar, Sarbobhouma Ghosha, Dipanwita Ghosha, Mahima Misti Sarkar, Swarnendu Roy, Valorization of banana peel into α -amylase using one factor at a time (OFAT) assisted artificial neural network (ANN) and its partial purification, characterization, and kinetics study, Food Bioscience, Volume 53, June 2023, 102533, <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102533>
4. Shynkarenko L.M. Determination of the spectrum of action of the enzyme preparation from *Streptomyces recifensis* var. lyticus 2435/M / L.M. Shinkarenko, L.G. Zholner, T.S. Todosiichuk // Express news: science, technology, production. - 1998. - No. 4. - P. 49.
5. R. Gupta, P. Gigras, H. Mohapatra, V.K. Goswami, B. Chauhan, Microbial α -amylases: a biotechnological perspective, Process Biochemistry Vol. 38, Issue 11, 30 June 2003, Pages 1599-1616, [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0)
6. Gregirchak N.M., Antonyuk M.M., Butsenko L.M. Immobilized enzymes and cells in biotechnology: Study. manual - K.: NUHT, 2015. - 267 p.
7. Chervakov O.V., Adriyanova M.V. Mathematical modeling and optimization of objects of chemical technology [Text]: synopsis of lectures from the course "Mathematical modeling and optimization of objects of chemical technology" / Chervakov O.V., Adriyanova M.V.; DVNZ UDHTU. - Dnipropetrovsk, 2016. - 33 p.

Ivchenko Y., Mitina N. (2023)

DYNAMICS OF INFLUENCE OF SOME HEAVY METALS ON THE BIOSYNTHETIC CAPACITY OF *STREPTOMYCES RECEFENSIS* VAR. *LYTICUS* 2P-15 FOR THE SYNTHESIS OF AMYLOLYTIC ENZYMES.

BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 14(3-4): 55-63.

<https://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/article/view/48290>

[http://dx.doi.org/10.31548/biologiya14\(3-4\).2023.005](http://dx.doi.org/10.31548/biologiya14(3-4).2023.005)

Abstract. Modern biotechnology of enzymes is a promising and rapidly developing branch of industrial biotechnology, which requires new promising research in the aspect of optimizing the conditions of biosynthesis of enzymes. Modulation of the biosynthetic activity of producer strains allows to significantly increase the economic output of production. The most important factor in increasing efficiency is the composition of the nutrient medium, which can be optimized depending on the needs of the microorganisms. Within the framework of a complex study of the optimization of the composition of the nutrient medium by the simplex method of mathematical modeling, the aim of the work is to study the effect of some heavy metal ions on the biosynthetic capacity of the strain *Streptomyces recefensis* var. *lyticus* 2P-15. The influence of some heavy metal ions on the biosynthetic capacity of the strain *Streptomyces recefensis* var. *lyticus* 2P-15 in terms of synthesis of amylolytic enzymes, accumulation of biomass and protein. The object of the study is the strain *Streptomyces recefensis* var. *lyticus* 2P-15, obtained by three-stage selec-

tion of the producer. The simplex method of selecting the composition of the environment was used for the research. Standard methods for determining biomass and amylolytic activity were used to analyze biosynthetic activity. It was established that adding Co, Mo, and Cd ions at a concentration of 0.00001 and 0.0005 mg/ml inhibits the growth of biomass, but increases the protein content by 13-57%, respectively. It was determined that the addition of Co, Mo, Cd ions in different concentrations helps to increase both the quantitative and qualitative composition of the synthesized enzymes, and the best response was an increase in amylolytic activity by 354% compared to the control. The prospect of further research into the optimization of the biosynthesis of actinomycetes simplex by the method of other aspects of its regulation will increase the biosynthetic capacity of the studied strain, which will positively affect the economic output of the production of amylolytic enzyme preparations by obtaining microbial synthesis.

Keywords: amylolytic enzymes, biosynthetic capacity, mathematical modeling, heavy metal ions, nutrient medium.
