

УДК 577.152.34:577.151.5

ОСОБЛИВОСТІ РОСТУ І БІОСИНТЕЗУ ЕЛАЗАЗИ МУТАНТНИМ ВАРІАНТОМ *BACILLUS SP. 27-88ELS*⁺

О. В. Мацелюх
Н. А. Нідялкова
Л. Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

varbanets@serv.imv.kiev.ua

Вивчення динаміки росту культури *Bacillus sp. 27-88Els*⁺, а також характеру синтезу еластази показало, що ензимоутворення відбувається одночасно з ростом культури. Встановлено вплив різних джерел вуглецю і азоту на синтез еластази культурами *Bacillus sp. 27-88Els*⁺ і *Bacillus sp. 27*. Показано, що синтез еластази батьківським штамом *Bacillus sp. 27* залежить від присутності в середовищі росту низькомолекулярних джерел як вуглецю, так і азоту, при цьому вплив регуляції такого виду на синтез еластази мутантним варіантом послаблений. Додаючи в середовище росту аланін як єдине джерело азоту, виявили еластазну активність в культуральній рідині мутантного варіанта *Bacillus sp. 27-54Els*⁻.

Ключові слова: еластаза, біосинтез, *Bacillus sp.*

Основною умовою існування будь-якого живого організму є наявність тонкої, гнучкої, скоординованої системи регуляції, в якій усі елементи тісно зв'язані один з одним. У протеїновому синтезі не тільки кількісний і якісний склад протеїнів, але й час синтезу мають велике значення. Від цього залежить пристосованість мікроорганізмів до умов навколишнього середовища. Синтез протеїну регулюється зовнішніми і внутрішніми чинниками, які визначають синтез у клітині відповідної кількості й набору протеїнів, необхідних для виконання фізіологічних функцій. Бацили синтезують різноманітні позаклітинні ензими, серед яких однією з найбільш вивчених є група протеаз. Гени багатьох із цих ензимів клонують і секвонують, для деяких протеїнів встановлено просторові структури, але при цьому питання про функціональну роль і механізми регуляції їх біосинтезу дотепер залишається недостатньо з'ясованим. Раніше за допомогою N-нітрозогуанідину було отримано мутант *Bacillus sp. 27-88Els*⁺ з підвищеним синтезом еластази в 2,5 рази порівняно з батьківським штамом [1, 2]. Встановлено, що, на відміну від батьківського штаму, в якого виявлено два ензими з еластолітичною активністю, мутантний варіант здатен синтезувати лише один з них. Це дало підстави припустити, що синтез ензиму збільшився завдяки регуляторним змінам.

Метою даної роботи було встановити особливості змін у біосинтезі еластази мутантним варіантом *Bacillus sp. 27-88Els*⁺.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були штами *Bacillus sp. 27-88Els*⁺ з підвищеною в 2,5 рази еластазною активністю, *Bacillus sp. 27-54Els*⁻, у якого еластазну активність не було виявлено, а також батьківський штам *Bacillus sp. 27*. Штами *Bacillus sp. 27-88Els*⁺ і *Bacillus sp. 27-54Els*⁻ отримали раніше шляхом хімічного мутагенезу [1] з вихідного штаму *Bacillus sp. 27*, виділеного з води Чорного моря.

Культивування бактерій проводили на рідкому середовищі такого складу (г/л): KH_2PO_4 — 1,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,75; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,5; мальтоза — 1,0; желатин — 10,0; дріжджовий автолізат — 1,5 мл або 150 мг (0,15 г) [3].

Динаміку росту культури вивчали в умовах вирощування на рідкому живильному середовищі зазначеного складу при 42 °С, на качалці при 200 об/хв. Інокулюм отримували з однодобової культури, вирощеної в пробірках на скошеному м'ясопептонному агарі (МПА). Приріст біомаси визначали нефелометрично за довжини хвилі 590 нм. В культуральній рідині, звільненій від клітин центрифугуванням при 6 000g, 30 хв, визначали рН, вміст протеїну, ензиматичну

активність. Визначення біомаси проводили ваговим методом після її відділення від культуральної рідини, відмивання дистильованою водою та висушування до постійної маси при 100 °С.

Для вивчення впливу різних джерел азоту та вуглецю на біосинтез еластази і ростові параметри культур як джерела азоту використовували: метіонін, валін, серин, аспарагінову кислоту, треонін, глутамінову кислоту, аланін, лейцин, аспарагін, ізолейцин, гліцин, аргінін солянокислий, гістидину гідрохлорид, фенілаланін, нітрат натрію, сульфат амонію, желатин, дріжджовий автолізат в концентрації 0,2% в перерахунку на вміст азоту в середовищі. Моносахариди (арабіноза, галактоза, глюкоза, ксилоза, манноза, рамноза, сорбоза); дисахариди (мальтоза, лактоза, сахароза); трисахариди (рафіноза), багатоатомні спирти (маніт, сорбіт, дульцит), а також соєве та кукурудзяне борошно слугували джерелами вуглецю. Їх вносили в концентрації 0,55% у перерахунку на вміст вуглецю в середовищі. Як контроль використовували стандартне середовище описаного вище складу.

Протеолітичну (казеїнолітичну) активність визначали за методом Ансона в модифікації Петрової [4], еластазу (ЕА) — колориметрично за інтенсивністю забарвлення розчину при ензиматичному гідролізі Еластину-Конго Рот [5]. Усі експерименти проводили у трьох повторностях. Наведено середні арифметичні величини; відхилення від середнього значення не перевищувало 5%.

Результати та обговорення

Встановлення фізіологічних шляхів регуляції базується на вивченні характеру біосинтезу ензимів. У мікроорганізмів існує декілька типів синтезу гідролаз: кінетична модель (утворення ензимів відбувається в експо-

ненційній фазі одночасно з ростом продуктивності), модифікація кінетичної моделі (синтез ензимів триває і після припинення росту культури, що характерно для катаболітичних ензимів), двофазний процес (ензими починають синтезуватися в період уповільнення або повного припинення росту мікроорганізмів). У більшості випадків синтез катаболітичних ензимів мікроорганізмів описується кінетичною моделлю і відбувається в експоненційній та постекспоненційній фазах розвитку культур. Вивчення динаміки росту культури *Bacillus* sp. 27-88Els⁺ показало (рис. 1), що максимальний синтез еластази відзначається в експоненційній фазі на 18-ту год культивування, що збігається з максимальною швидкістю росту культури. Таким чином, цей ензим можна віднести до катаболітичних ензимів, тобто таких, які синтезуються за кінетичною моделлю, коли ріст культури і синтез еластази відбуваються одночасно.

Основними механізмами, які регулюють катаболітичні шляхи, є індукція синтезу ензимів та катаболітна репресія. Катаболітну репресію можна розглядати як пристосування клітини до використання насамперед найбільш легкодоступних джерел енергії. Біосинтез протеолітичних ензимів мікроорганізмами залежить від джерел харчування, в основному вуглецю й азоту в середовищі. Присутність в живильному середовищі сполук азоту і вуглецю, які швидко метаболізуються клітинами, підтримує високий пул амінокислот. Це призводить до інтенсивного синтезу нетрансляційних РНК і мРНК внутрішньоклітинних протеїнів. При цьому вміст фактора ініціації і РНК-полімерази, яка бере участь у синтезі мРНК екзопротеаз, незначний, унаслідок чого зменшується частота транскрипції мРНК екзопротеаз. Вичерпання в процесі росту будь-якого із цих субстратів спричинює зниження вмісту вільних амінокислот і посилення синтезу екзоензимів [6].

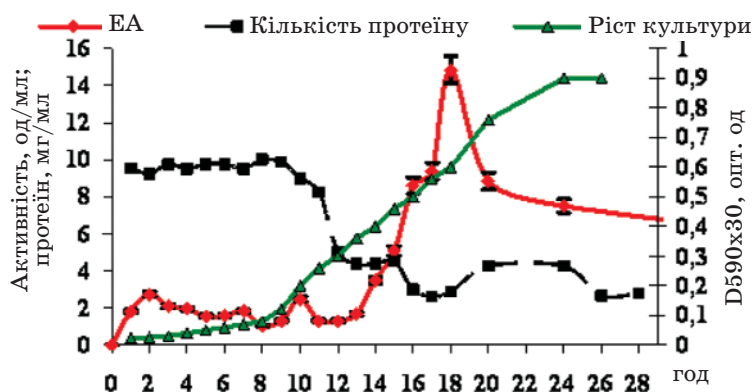


Рис. 1. Динаміка синтезу еластази культурою *Bacillus* sp. 27-88Els⁺

Тобто, продукти дії ензимів можуть репресувати їх синтез, і таким чином синтез зовнішньоклітинних протеаз пригнічується в присутності амінокислот або пептидів. Для *Bacillus megaterium* показано, що амінокислоти, які синтезуються ендогенно в постлогарифмічній і стаціонарній фазах, зупиняють синтез протеази [7]. Виявлено, що окремі амінокислоти здатні різною мірою пригнічувати синтез екзопротеаз *Arthrobotrys compacta*, при цьому найбільш виражений інгібуєчий ефект спостерігався для триптофану, орнітину та гістидину [8]. Аналіз джерел літератури показав, що іони амонію також інгібують продукцію протеаз за типом азотметаболічної репресії [9]. Так, встановлено, що іони амонію інгібують продукцію протеаз *Bacillus intermedius* [10]. Біосинтез цих сполук можна активізувати не тільки внаслідок заміни амонію в живильному середовищі на менш ефективні джерела азоту, але й за допомогою специфічних мутацій, які усувають репресію амонієм. Загалом вплив амінокислот на накопичення протеаз неоднозначний і може спричинювати як індукцію, так і репресію синтезу ензимів.

У результаті досліджень встановлено, що високомолекулярні й низькомолекулярні сполуки азоту (окремі амінокислоти й неорганічні сполуки) неоднаково впливають на синтез екзопротеаз батьківським штамом, мутантними варіантами з підвищеним синтезом еластази і за його відсутності. Показано, що всі досліджені сполуки азоту тією чи іншою мірою пригнічували синтез еластази *Bacillus sp. 27-88Els⁺* (рис. 2), при цьому синтез неспецифічних протеаз, які визначали за активністю до казеїну, практично не змінювався.

Найбільш виражений репресуючий ефект мали глутамінова й аспарагінова кислоти, триптофан і дріжджовий автолізат, які повністю пригнічували біосинтез еластази мутантним варіантом *Bacillus sp. 27-88Els⁺*. Закономірностей щодо впливу низькомолекулярних і високомолекулярних сполук азоту на продукування ензиму не було встановлено. Водночас синтез еластази батьківським штамом *Bacillus sp. 27* був більш залежний від джерела азоту в культуральному середовищі (рис. 2).

Так, неорганічні сполуки азоту, а також деякі амінокислоти (аспарагінова, глутамінова, гістидин, аспарагін, метіонін і валін) повністю пригнічували його еластазну активність, а желатин, як єдине джерело азоту, навпаки, стимулював. Це може свідчити про змішаний тип регуляції синтезу еластази вихідною культурою, яка здійснюється за рахунок як індукції (желатин), так і репресії синтезу [8]. Дослідження впливу різних концентрацій джерел азоту (рис. 3) в культуральному середовищі *Bacillus sp. 27-88Els⁺* показало, що синтез еластази відбувається за концентрації джерела азоту в середовищі не більше 0,2%. Підвищення концентрації повністю пригнічує синтез ензиму. Цікавим фактом було те, що на середовищі з аланіном мутант, у якого не виявлено еластазної активності, — *Bacillus sp. 27-54Els⁻* синтезує цей ензим, але в невеликій кількості — до 2 од/мл. Дане явище може означати, що в цьому штамі синтез еластази не відсутній, а, ймовірно, заблокований певним регулювальним механізмом (можливо, підвищений синтез власного інгібітора).

Динаміка накопичення протеїну і біомаси (рис. 4, 5) була практично однаковою

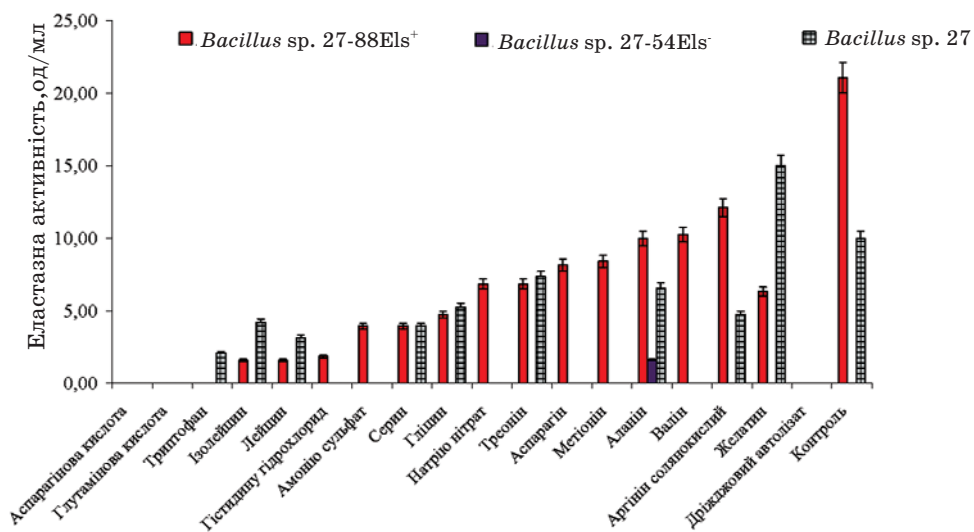


Рис. 2. Вплив джерел азоту на еластазну активність штамів *Bacillus sp. 27-88Els⁺*, *Bacillus sp. 27-54Els⁻* і *Bacillus sp. 27*

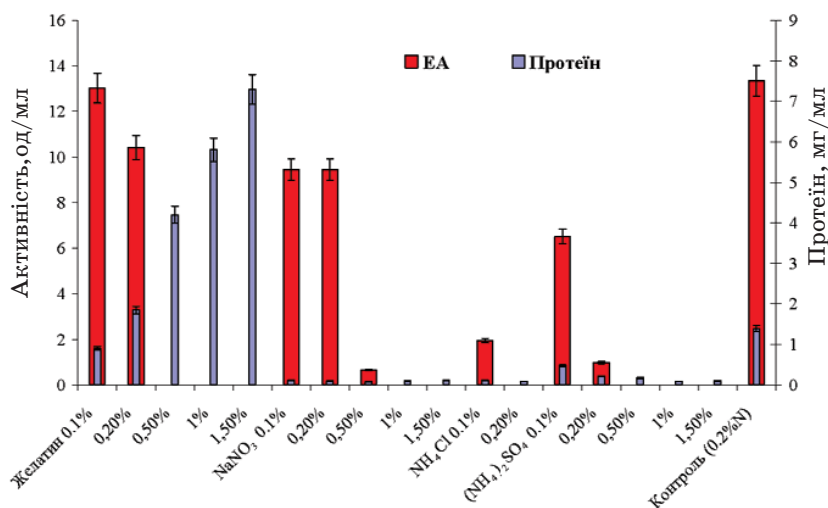


Рис. 3. Синтез эластазы мутантным вариантом *Bacillus* sp. 27-88Els⁺ за різних концентрацій джерел азоту

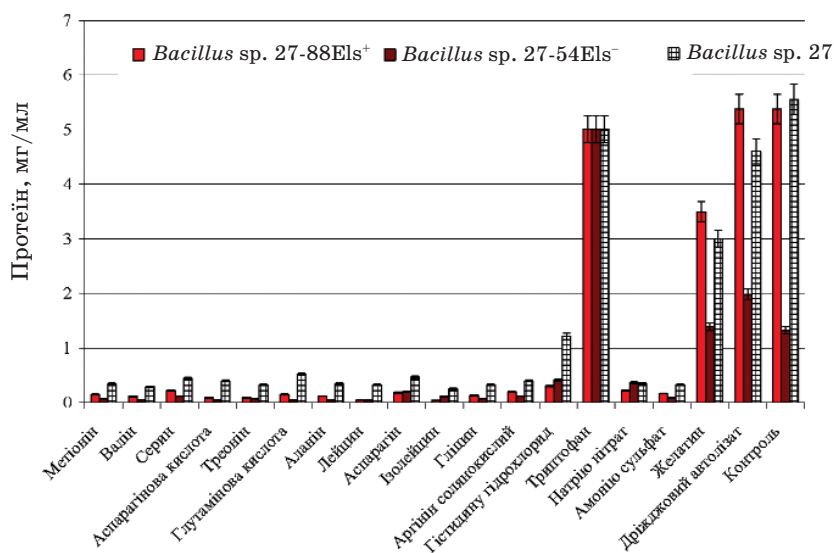


Рис. 4. Вміст протеїну в культуральному середовищі *Bacillus* spp. за наявності різних джерел азоту

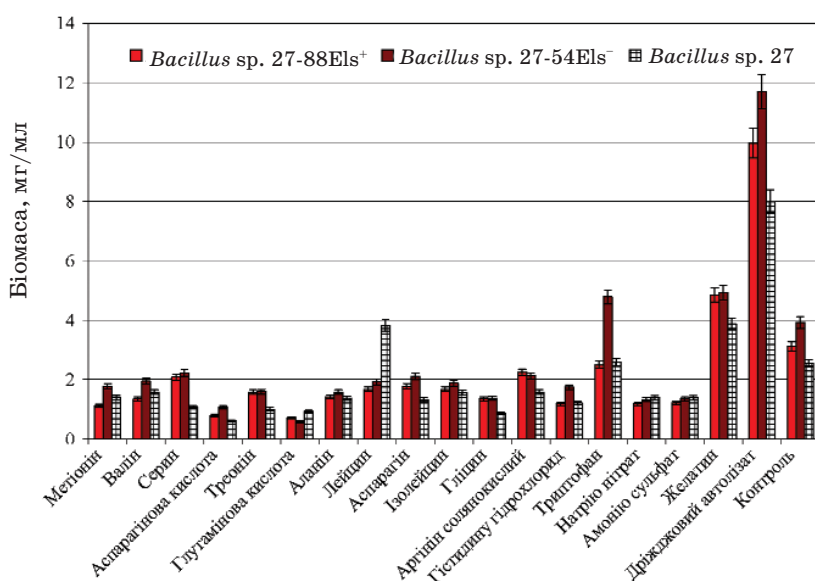


Рис. 5. Вміст біомаси в культуральному середовищі *Bacillus* spp. за наявності різних джерел азоту

у всіх трьох досліджуваних штамів, але зростала у варіантах з желатином і дріжджовим автолізатом. Найбільший ріст *Bacillus* sp. 27-88Els⁺, 27-54Els⁻ і 27 спостерігався саме на середовищах з дріжджовим автолізатом. Це може бути пов'язано з тим, що він є джерелом вітамінів групи В, мікроелементів (залізо, мідь, молібден, цинк), які можуть виступати як кофактори під час біосинтезу протеїну, а також вуглеводу трегалози, однак при цьому синтез еластази не відбувається.

Досліджуючи вплив різних джерел вуглецю на синтез еластази, встановили, що в процесі вирощування на середовищах з глюкозою, манітом, сорбозою або сахарозою, як єдиними джерелами вуглецю (рис. 6), синтез еластази батьківським штамом *Bacillus* sp. 27 повністю пригнічувався. Крім того, показано, що збільшення мальтози в середовищі до 10 г/л також повністю інгібувало біосинтез еластази, а це може свідчити про вуглецеву катаболітну репресію синтезу еластази даним штамом. Натомість, мутантний варіант *Bacillus* sp. 27-88Els⁺ не був таким чутливим до збільшених концентрацій різних вуглеводів у середовищі і синтезував ензим на всіх використаних в роботі речовинах. Під час росту на арабінозі біосинтез еластази у *Bacillus* sp. 27-88Els⁺ був практично такий самий, як і в контрольному варіанті. Слід, однак, зауважити, що синтез еластази мутантним варіантом знижувався в 6–7 разів у присутності сорбози, лактози, рафінози, соєвого і кукурудзяного борошна, а також багато-

атомних спиртів — дульциту, маніту, сорбіту. Практично ті самі закономірності спостерігалися і в дослідженні синтезу неспецифічних протеаз: батьківський штам був більшою мірою залежний як від джерела вуглецю в середовищі, так і від його кількості.

Накопичення біомаси і протеїну (рис. 7, 8) у всіх трьох штамів зростало на комплексних середовищах з кукурудзяним і соєвим борошном, желатином і дріжджовим автолізатом (контрольне). Вміст протеїну в культуральному середовищі у всіх штамів був дещо збільшений в присутності ксилози і сорбози.

Вивчення зміни рН культурального середовища *Bacillus* sp. 27-88Els⁺ на 18-ту год культивування свідчить (рис. 9), що зниження рН до значення менше 5 пригнічує синтез еластази (глутамінова і аспарагінова кислоти, гістидину гідрохлорид). Оптимальними для синтезу еластази були кінцеві показники рН від 6,5 до 8. За лужних значень рН 8–8,2 еластазна активність була максимальною під час росту на желатині й лише для *Bacillus* sp. 27. Для *Bacillus* sp. 27-88Els⁺ найвище значення рН 8,2 було на середовищі з ізолейцином, при цьому синтез еластази знижувався. Усе це може свідчити про те, що еластаза мутантного штаму нестійка до знижених і підвищених (більше 8) значень рН.

Таким чином, еластаза *Bacillus* sp. 27-88Els⁺ є конститутивним катаболітним ензимом, синтез якого описується кінетичною моделлю

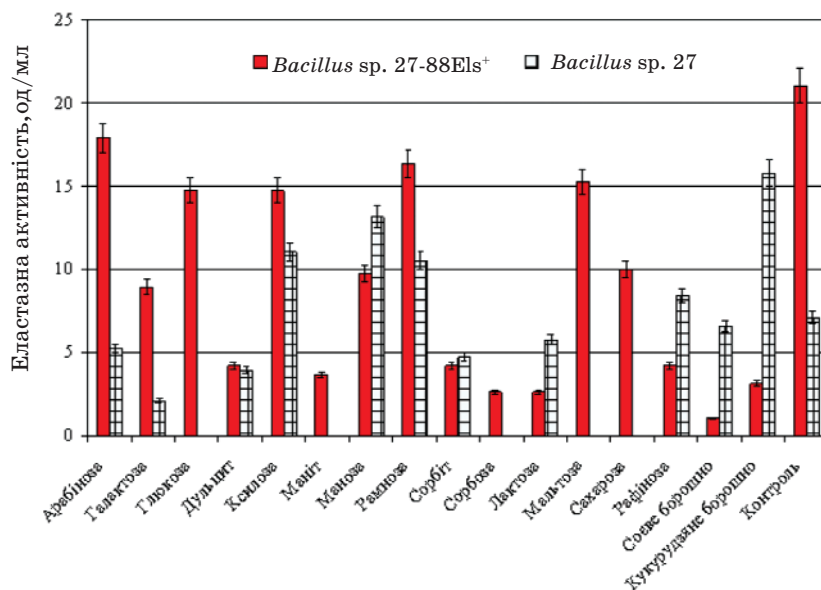


Рис. 6. Вплив різних джерел вуглецю на еластазну активність штамів *Bacillus* sp. 27-88Els⁺ і *Bacillus* sp. 27

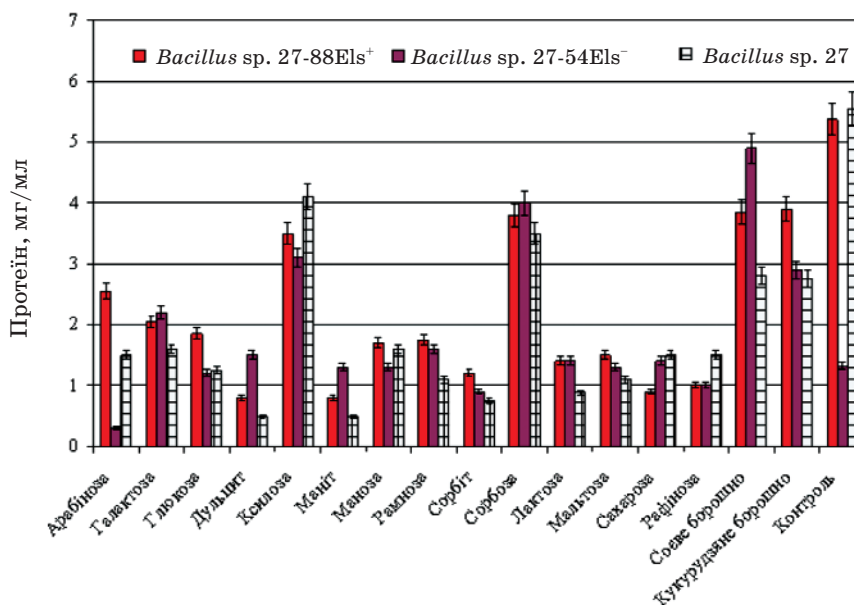


Рис. 7. Накопичення протеїну культурами *Bacillus spp.* за різних джерел вуглецю в середовищі

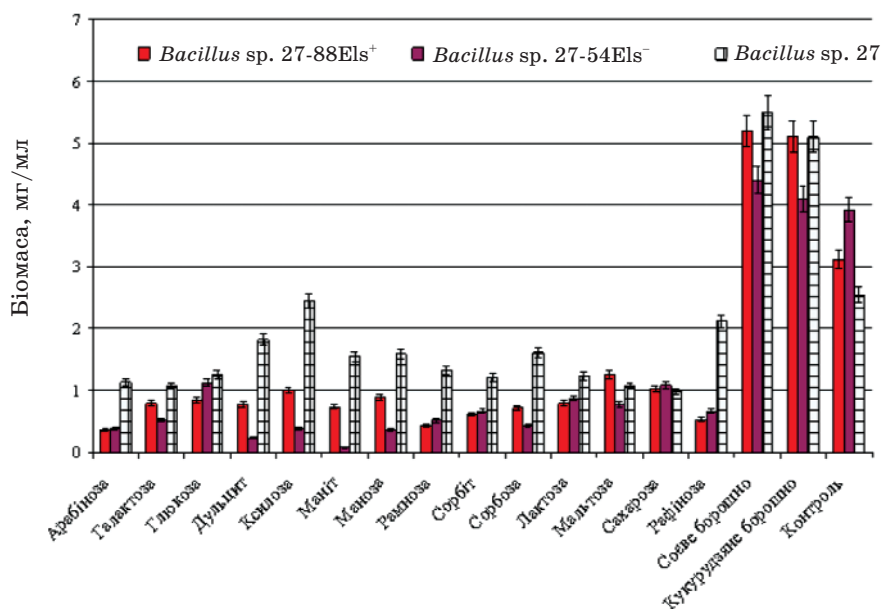


Рис. 8. Накопичення біомаси культурами *Bacillus spp.* за різних джерел вуглецю в середовищі

ензимоутворення. Синтез еластази батьківського штаму *Bacillus sp. 27* регулюється катаболітною репресією за змішаним типом (як вуглецева, так і азотна), і вплив цього виду регуляції на синтез еластази мутантним варіантом найімовірніше послаблений. Синтез еластази *Bacillus sp. 27-88Els⁺* залежить від концентрації джерела азоту в середовищі: з підвищенням вмісту азоту до 0,5% синтез ензиму припиняється. Синтез еластази у мутантного варіанта

Bacillus sp. 27-54Els⁻ очевидно заблокований власним інгібітором, який взаємодіє з ензимом за допомогою алостеричних взаємодій, що впливають на активність ензиму.

Автори висловлюють подяку проф. В. О. Іваниці (зав. кафедрою мікробіології і вірусології Одеського національного університету ім. І. І. Мечникова) за надану культуру *Bacillus sp. 27*.

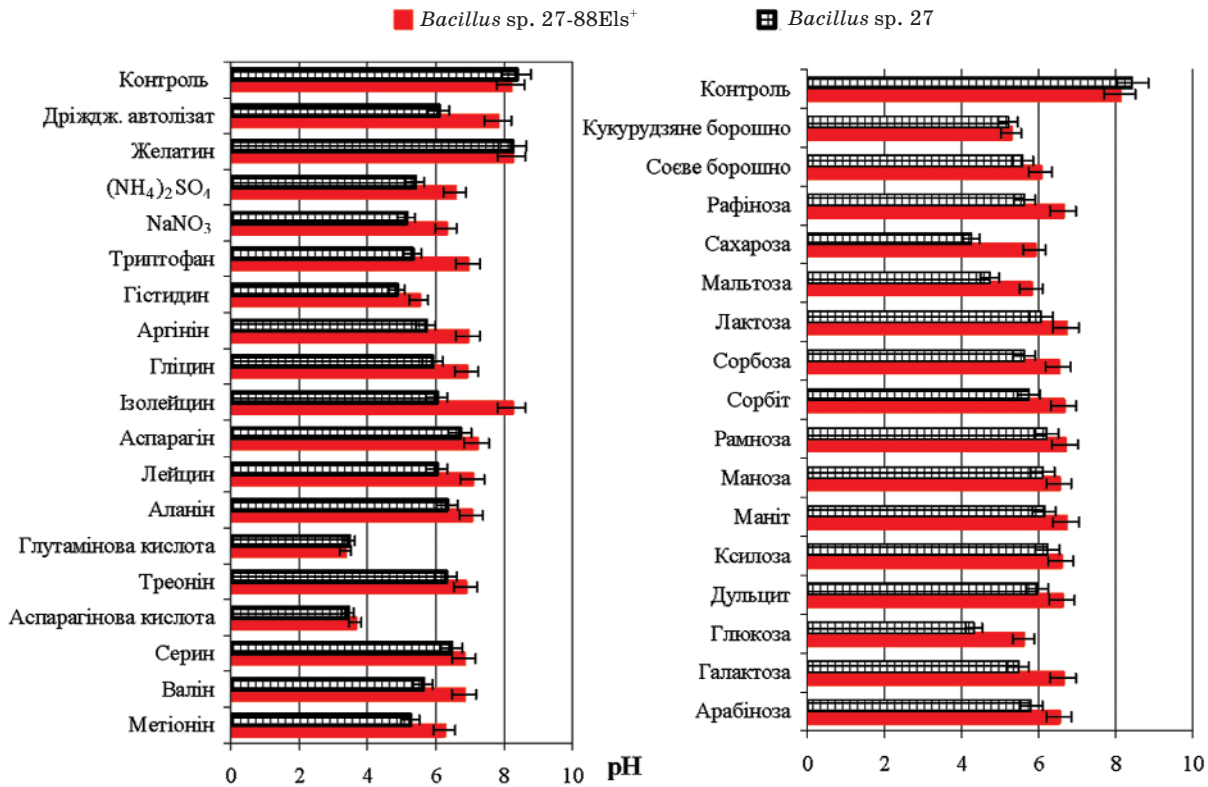


Рис. 9. Зміна рН культуральних середовищ *Bacillus sp. 27-88Els+* і *Bacillus sp. 27* під час вирощування на різних джерелах азоту та вуглецю (вісь ординат)

ЛІТЕРАТУРА

1. Мацелюх О. В. Отримання мутантів *Bacillus sp.* з підвищеною здатністю до синтезу еластази // Біотехнологія. — 2010. — Т. 3, № 2. — С. 42–47.
2. Шубчинська А. С., Варбанець Л. Д., Нагорна С. С., Сафронова Л. А. Скринінг мікроорганізмів — продуцентів протеаз // Мікробіол. журн. — 2008. — Т. 70, № 1. — С. 3–9.
3. Колтукова Н. В., Васкивнюк В. Т. Подбор методов выделения протеолитического комплекса из *Bacillus mesentericus* 316м при глубинном выращивании // Там же. — 1980. — Т. 42, № 2. — С. 245–248.
4. Петрова И. С., Винцюнайме М. Н. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения // Прикл. биохим. микробиол. — 1966. — Т. 2, № 1. — С. 322–327.
5. Trombridg G. O., Moon H. D. Purification of human elastase // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. — 1972. — V. 141, N 3. — P. 928–931.
6. Иваница В. А. Биосинтез внеклеточных протеаз культурой *Aspergillus candidus*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1978. — 23 с.
7. Fayyaz U. D., Chaloupka J. Regulation of formation of proteases in *Bacillus megaterium* IV. The formation of the enzyme in the sporogenous strain KM // Folia Microbiol. — 1999. — V. 15, N 4. — P. 267–274.
8. Намазов Н. П., Касумова С. Ю., Гасанов Х. А., Мурадов П. З. Влияние различных источников азота на образование протеолитических ферментов гриба *Arthrotritys contracta* // Вестник МГОУ. — М.: Изд-во МГОУ. — 2010. — № 1. — С. 48–51.
9. Шамсутдинов Т. Р., Балабан Н. П., Марданова А. М. и др. Выделение и характеристика глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* на разных фазах роста // Биоорг. химия. — 2008. — Т. 34, № 3. — С. 322–326.
10. Балабан Н. П., Шарипова М. Р., Габдрахманова Л. А. и др. Синтез и секреция протеиназ *Bacillus intermedius* на поздних стадиях спорообразования // Микробиология. — 2003. — Т. 72, № 3. — С. 338–342.

**ОСОБЕННОСТИ РОСТА
И БИОСИНТЕЗА ЭЛАСТАЗЫ
МУТАНТНЫМ ВАРИАНТОМ
BACILLUS sp. 27-88ELS⁺**

*Е. В. Мацелюх
Н. А. Нидялкова
Л. Д. Варбанец*

Институт микробиологии и вирусологии
НАН Украины, Киев

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Изучение динамики роста культуры *Bacillus* sp. 27-88Els⁺, а также характера синтеза эластазы показало, что образование энзима происходит одновременно с ростом культуры. Установлено влияние разных источников углерода и азота на синтез эластазы культурами *Bacillus* sp. 27-88Els⁺ и *Bacillus* sp. 27. Показано, что синтез эластазы исходным штаммом *Bacillus* sp. 27 зависит от присутствия в среде роста низкомолекулярных источников как углерода, так и азота, при этом влияние регуляции такого вида на синтез эластазы мутантным вариантом ослаблено. Обнаружена эластазная активность в культуральной жидкости мутантного варианта *Bacillus* sp. 27-54Els⁻ при добавлении в качестве единственного источника азота аланина.

Ключевые слова: эластаза, биосинтез, *Bacillus* sp.

**CHARACTERISTICS OF GROWTH
AND ELASTASE PRODUCTION
BY MUTANT
OF *BACILLUS* sp. 27-88ELS⁺**

*O. V. Matselyukh
N. A. Nidialkova
L. D. Varbanets*

Institute of Microbiology and Virology
of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

The dynamic of growth and character of elastase synthesis by strain of *Bacillus* sp. 27-88 Els⁺ was investigated. It was established that elastase synthesis occurs simultaneously by growth of culture. Influence of different carbon and nitrogen sources on elastase synthesis by strain of *Bacillus* sp. 27-88Els⁺ and *Bacillus* sp. 27 was studied. It was shown that elastase synthesis via parental strain of *Bacillus* sp. 27 depends on low-molecular sources of carbon and nitrogen. Influence of such kind of regulation on elastase synthesis via mutant is depressed. It was established the elastolytic activity in the culture fluid of the mutant of *Bacillus* sp. 27-54Els⁻ at addition of alanine as the sole nitrogen source.

Key words: elastase, biosynthesis, *Bacillus* sp.