

Биричевская Л.Л., Зинченко А.И., Винтер М.А., Бруякин С.Д.*

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

**Международный государственный экологический институт им. А.Д.Сахарова*

Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

Изучение влияния состава питательной среды на продукцию фосфолипазы D клетками *Streptomyces netropsis*

Фосфолипаза D (ФЛД; КФ 3.1.4.4) – фермент, который катализирует гидролиз фосфодиэфирной связи фосфолипидов, образуя фосфатидную кислоту и спиртовой остаток. В дополнение к гидролитической активности, ФЛД также может катализировать замещение полярных групп фосфолипидов по процессу, называемому трансфосфатидилирование [1]. Благодаря доступности ФЛД из растений и микроорганизмов и достаточно высокой эффективности процесса трансфосфатидилирования, этот подход применяется для получения в аналитическом и препаративном количествах разнообразных фосфолипидов [2].

Как известно, уровень биосинтеза ферментов микроорганизмами зависит не только от генетических особенностей штаммов-продуцентов, но и от состава питательной среды и условий их культивирования. В этой связи, целью настоящего исследования было изучить влияние культуральной среды на образование ФЛД клетками актиномицета *Streptomyces netropsis*, селектированного ранее в лаборатории молекулярной биотехнологии Института микробиологии НАН Беларуси и депонированного в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси под номером БИМ В-428Д [3].

Ранее нами был подобран состав культуральной среды для максимальной продукции ФЛД штаммом *S. netropsis* БИМ В-235 (исходный штамм при селекции штамма *S. netropsis* БИМ В-428Д) и выявлено, что накопление фермента в культуральной жидкости (КЖ) происходит только при выращивании бактерий на натуральных средах, богатых органическим азотом.

На начальном этапе настоящего исследования мы изучили влияние двух питательных сред (II и III), рекомендованных Международным проектом по стрептомицетам (ISP) для культивирования микроорганизмов рода *Streptomyces*, на активность ФЛД в КЖ *S. netropsis* БИМ В-428Д, по сравнению с оптимизированной питательной средой, подобранной нами ранее [4] (I).

Среды для культивирования микроорганизмов:

Глюкозо-дрожжевая среда (I): дрожжевой экстракт – 2%; глюкоза – 1%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1%.

Глюкозо-пептонно-дрожжевая среда (II): пептон – 1%; дрожжевой экстракт – 0,5%; бактотриптон – 0,2%; NaCl – 0,6%; глюкоза – 1%.

Глюкозо-дрожжевая модифицированная (GYM) среда (III): солодовый экстракт – 1%; дрожжевой экстракт – 0,5%; глюкоза – 0,5%.

Глюкозу вносили в среды после стерилизации; посевной материал вносили в количестве 5 об.%. Значение кислотности сред (рН) до стерилизации составляло 7,1. Глубинное культивирование бактерий проводили в течение 24 или 36 ч при температуре 30°C; скорости вращения орбитальной микробиологической качалки 200 об/мин. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Как следует из данных, представленных в таблице, несмотря на более медленное накопление биомассы, культивирование *S. netropsis* на исходной среде I, включающей 2% дрожжевого экстракта и 1% глюкозы, является наиболее предпочтительным. При этом достигается максимальное накопление активности ФЛД в расчете как на 1 мл фильтрата КЖ, так и на 1 мг сухой биомассы. Следует отметить, что среда I содержит наименьшее количество компонентов и наиболее проста в приготовлении.

Влияние питательной среды на рост *S. netropsis* и накопление ФЛД в КЖ

Среда	Культивирование (24 ч)					Культивирование (36 ч)				
	Биомасса, мг/мл	Активность ФЛД				Биомасса, мг/мл	Активность ФЛД			
		ед/мл КЖ	%	ед/мг биомассы	%		ед/мл КЖ	%	ед/мг биомассы	%
I	1,88	2,50	83	1,33	100	7,80	3,83	100	0,49	100
II	3,65	3,00	100	0,82	62	7,95	3,17	83	0,40	81
III	2,90	2,55	85	0,88	66	7,75	3,67	96	0,47	96

С целью получения экспериментального образца препарата ФЛД использовали 4 колбы Эрленмейера объемом 2 л, содержащие по 500 мл питательной среды I. По окончании выращивания биомассу бактерий отделяли путем фильтрации через бязь.

Полученный фильтрат КЖ (около 1,5 л) концентрировали в два приема методом ультрафильтрации через мембрану ПС-20М с пропускной способностью до 20 кДа фирмы «Владипор» (Россия) под давлением 20 psi (около 1,5 бар) в ячейке для ультрафильтрации объемом 1 л. Процесс осуществляли при температуре 4°C в течение 20 ч, до достижения 9-ти кратной степени концентрирования.

Сухой ферментный препарат получали путем осаждения белков, содержащихся в концентрате, охлажденным ацетоном, как было описано нами ранее [5].

В результате было наработано 720 мг сухого препарата частично очищенной ФЛД *S. netropsis* БИМ В-428Д с суммарной трансфосфатидилирующей активностью около 300 мкмоль/мин в реакции синтеза 5'-фосфатидилтимидина.

Наработанный препарат ФЛД характеризовался следующими показателями: внешний вид – сухой тонкодисперсный порошок светло-коричневого цвета; растворимость – хорошо растворим в воде; содержание

белка 0,1–0,15 мг/мг препарата (метод М. Брэдфорд [6]); трансфосфатилирующая активность – около 0,42 мкмоль/мин·мг порошка (в реакции синтеза 5'-фосфатидилтимидина из соевого фосфатидилхолина и тимидина в буфер-хлороформной реакционной среде).

Таким образом, в результате проведенных исследований была подобрана питательная среда для культивирования штамма-продуцента ФЛД и наработан экспериментальный образец препарата этого фермента.

Литература:

1. Yang, S. Transphosphatidylation by phospholipase D / S. Yang, S. Freer, A. Benson // J. Biol. Chem. – 1967. – Vol. 242. – P. 477–484.
2. Industrial uses of phospholipases: current state and future applications / S. Cerminati [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2019. – Vol. 103, № 6. – P. 2571–2582.
3. Штамм бактерий *Streptomyces netropsis*, продуцирующий фосфолипазу D: пат. 11915 Респ. Беларусь / Л.Л. Биричевская, Л.А. Ерошевская, А.И. Зинченко; заявл. 15.08.2007; опубл. 30.06.2009.
4. Биричевская, Л.Л. Биосинтез, свойства и применение фосфолипазы D *Streptomyces netropsis* БИМ В-235: дис. канд. биол. наук: 03.00.07 / Л.Л. Биричевская; Минск, 2009. – 148 с.
5. A comparison of enzymatic phosphorylation and phosphatidylation of β -L- and β -D-nucleosides / L.L. Birichevskaya [et al.] // Biotechnol. Lett. – 2007. – Vol. 29, № 4. – P. 585–591.
6. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.