

ОТРИМАННЯ МУТАНТІВ *Bacillus* sp. З ПІДВИЩЕНОЮ ЗДАТНІСТЮ ДО СИНТЕЗУ ЕЛАСТАЗИ

О. В. Мацелюх

Інститут мікробіології та вірусології НАН України, Київ

E-mail: oivanko@yahoo.com

Проведено хімічний мутагенез штаму-продуцента еластолітичних ензимів *Bacillus* sp. 27 за допомогою N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину. Підвищена еластазна активність виявилась у 2,1% з 1 000 досліджених мутантних варіантів, а залишалася стабільною протягом 6 місяців лише у 7 варіантів. Рівень еластазної активності у відібраних варіантів був підвищений на 31–100% порівняно з вихідною культурою. Було встановлено, що один з отриманих мутантів *Bacillus* sp. 27(88м) відрізняється від вихідної культури за динамікою синтезу ензимів і за такими фізико-хімічними показниками, як залежність активності ензимного комплексу від кислотності середовища й температури. Було показано, що мутант синтезує лише одну серинову протеазу з еластолітичною дією, що має молекулярну масу 28,7 кДа. При цьому синтез цього ензиму збільшується вдвічі порівняно з батьківським штамом.

Ключові слова: *Bacillus* sp., еластаза, мутанти, N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин.

Еластаза — ензим, який використовують у промисловості й медицині для гідролізу еластину — природного нерозчинного фібрилярного протеїну, що є складовою тканин більшості хребетних тварин. Описані в літературі еластази гетерогенні за субстратною специфічністю і каталітичними механізмами. Відомо, що ензими з еластолітичною дією виявлено серед серинових, тіолових, аспарагінових та металопротеаз. Раніше [1, 3] було встановлено, що бактерія *Bacillus* sp. 27 за умов глибинного культивування продукує в зовнішнє середовище протеолітичний комплекс ензимів, активний стосовно протеїнів тваринного походження: казеїну, фібрину, гемоглобіну, еластину, желатини. Метою роботи було підвищення біосинтезу еластази штамом-продуцентом індукованим мутагенезом та дослідження умов синтезу ензиму мутантними варіантами.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був штам-продуцент протеолітичного комплексу з еластолітичною дією *Bacillus* sp. 27, наданий нам із колекції живих культур кафедри мікробіології і вірусології ОНУ ім. І. І. Мечникова.

Культуру бактерії вирощували на м'ясопептонному агарі упродовж 18 год. Обробку суспензії клітин виконували за стандартною

методикою [6] 0,05% -м розчином N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину в 0,05 М трис-малеїновому буфері (рН 8,0) протягом 1 год при 37 °С. Різні розведення обробленої культури висівали на чашки з 5%-м желатиновим агаром. Відбір мутантів за максимальною зоною гідролізу желатини проводили через 2 доби. Еластазну активність відібраних варіантів визначали після їх культивування упродовж 24 год при 38–40 °С на рідкому живильному середовищі такого складу (г/л): мальтоза — 1,0; желатина — 10,0; 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; дріжджовий автолізат — 0,15, рН 7,0 [2].

Для одержання ензимного комплексу мутантний варіант *Bacillus* sp. культивували в колбах Ерленмєєра протягом 1 доби при 38–40 °С зі 100 мл рідкого живильного середовища описаного вище складу. Ензимний комплекс виділяли з культуральної рідини фракціонуванням сульфатом амонію. Для цього до культуральної рідини додавали суху сіль до кінцевої концентрації 90%. Суміш витримували 24 год при 4 °С, центрифугували при 5 000 g. Розділення ензиматичного комплексу здійснювали на колонці з Toyopearl DEAE-650(M) (2,5 × 40 см) фірми Toyosoda (Японія). Елюцію проводили 0,01 М Tris-HCl буфером, рН 7,5. Лінійний градієнт під час іонообмінної хроматографії створю-

вали розчином хлориду натрію від 0 до 1 М. Вміст протеїну реєстрували на СФ-26 при 280 нм.

Вплив кислотності реакційного середовища та температури на активність протеолітичного комплексу визначали в інтервалі температур від 4 до 70 °С та рН від 2,0 до 12,0, який створювали 0,05 М універсальним фосфатним буфером, а також в 0,05 М KH_2PO_4 –NaOH буфері, рН 6,0–8,0.

Вміст протеїну визначали методом Лоурі [7] за довжини хвилі 750 нм. Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін. Казеїнолітичну (загальну протеолітичну) активність визначали за методом Ансона в модифікації Петрової [4]; еластазну активність — колориметрично за інтенсивністю забарвлення розчину при ензиматичному гідролізі Конго-Рот — еластину [8].

Результати та обговорення

Одним із методів селекції промислово важливих мікроорганізмів є відбір мутантів зі зміненими спадковими ознаками. Як відомо, мутації зумовлюють біологічні зміни і поряд із процесом перенесення генів спричиняють генетичну мінливість, яка дає матеріал для еволюції та штучного відбору. За своїм походженням мутації бувають спонтанні й індуковані. Перші виникають з низькою частотою, що робить непрямий відбір спонтанних мутантів надзвичайно трудомістким. Вміст мутантів у мікробній популяції можна збільшити, якщо піддати їх штучному мутагенезу, що дозволить підвищити частоту виділення мутантів у 100–1 000 разів. Оскільки під час УФ-опромінення висока частота мутацій досягається за низького виживання клітин і часто виникаючої фотореактивації, то клітини культури *Bacillus* sp. піддавали дії хімічного мутагену N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину. Ця сполука алкілює азотисті основи в точці реплікації, де ДНК існує в одновитчастій формі, і зумовлює множинні мутації на обмеженій ділянці хромосоми (а також у різних ділянках хромосоми). У селекції продуцентів ензимів важливе значення має отримання конститутивних мутантів. Із цією метою слід використовувати аналоги субстратів, що не здатні спричинювати індукцію. На чашках, де такі сполуки є єдиним джерелом вуглецю й енергії або азоту, утворюються колонії мутантів, що синтезують відповідні ензими конститутивно. Таким субстратом ми обрали 5%-ну желатину, оскільки раніше [5] було встановлено, що

желатина в живильному середовищі не є індуктором еластолітичних ензимів *Bacillus* sp. 27 (рис. 1). Окрім того, під час розділення й очищення ензимного комплексу було виділено два ензими з еластолітичною дією, які мали широку субстратну специфічність, зокрема гідролізували желатину.

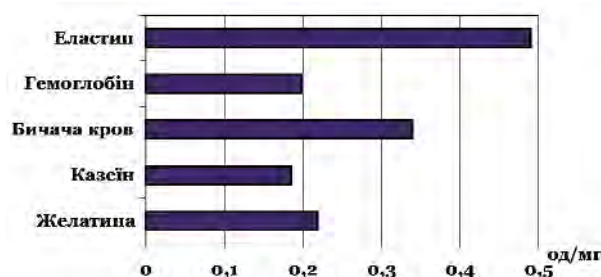


Рис. 1. Вплив протеїнових субстратів на еластазну активність *Bacillus* sp.

Відбір за максимальною зоною гідролізу желатини було проведено серед 1000 варіантів, оброблених N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином (табл.). Слід відзначити, що після оброблення мутагеном більшість колоній, які виростили на чашках, мали збільшений діаметр (понад 10 мм) зони гідролізу желатини порівняно з вихідним варіантом. Близько 50% досліджуваних варіантів мали зону гідролізу 20–26 мм. Але при цьому рівень еластазної активності, який визначали після культивування в рідкому живильному середовищі, виявився підвищеним лише у 2,1% варіантів. Ознака підвищеного синтезу ензиму залишилася стабільною протягом 6 місяців лише у 7 варіантів (рис. 2). Рівень еластазної активності у мутантів був підвищений на 31–100%, водночас рівень казеїнолітичної активності був знижений на 8–50%.

Інтерес становило дослідження деяких фізіологічних та фізико-хімічних властивостей отриманих мутантів. Для цього було обрано один з варіантів 88 м, який характеризувався максимальною еластазною активністю. Порівнюючи дві культури за показниками динаміки накопичення протеїну і зміни рН у процесі культивування (рис. 3), можна констатувати, що ці процеси у двох культур відбуваються синхронно і практично не відрізняються. Це свідчить про те, що загальні фізіологічні характеристики у мутантного варіанта не змінилися. Зовсім інша картина спостерігається, якщо дослідити динаміку синтезу ензимів (рис. 4). Якщо для вихідної культури характерний максимальний синтез ензимів з еластолітичною дією ближче до другої доби культивування, то

Показники відбору мутантних варіантів

	Вихідна культура	Культура, оброблена N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином
Вихідна концентрація клітин	3–5·10 ⁶	
Кількість колоній на чашці / розведення	7–10/10 ⁻⁵	5–10/10 ⁻²
Вживання, %	100	0,1
Кількість перевірених колоній	100	1 000
Максимальний діаметр зони гідролізу желатини, мм	10–12	20–26
Частота виявлення мутантів, % *	–	2,1

Примітка. * — частоту виявлення мутантів вираховували за кількістю знайдених варіантів з підвищеною еластазою активністю, яку визначали за активністю їхньої культуральної рідини.

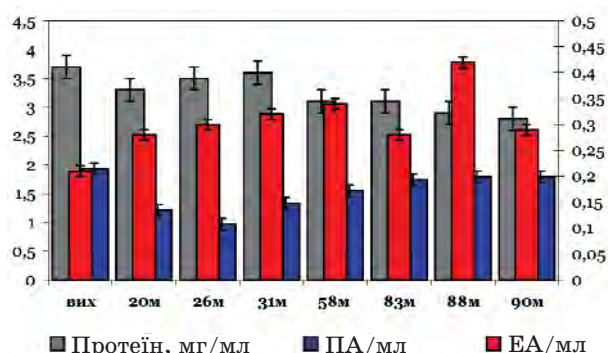


Рис. 2. Порівняння еластазної і казеїнолітичної активності вихідного штаму *Bacillus* sp. та його мутантних варіантів, де ПА і ЕА, відповідно, казеїнолітична і еластазна активність 1 мл культуральної рідини

для мутанта максимальний синтез еластази відбувається на першу добу культивування, а на другу — знижується на 87,5%, при цьому синтез казеїнолітичних ензимів на другу добу культивування залишається майже незмінним порівняно з вихідною культурою, у якій відбувається зниження цього показника на 40%.

Для подальшого вивчення фізико-хімічних властивостей ензимів було отримано частково очищені комплексні ензимні препарати за допомогою осадження сульфатом амонію 90%-го ступеня насичення. Дослідження активності комплексних ензимних препаратів вихідної культури і мутантного варіанта (88м) від рН середовища (рис. 5) показало, що в мутанта відсутній другий пік активності, який у препараті вихідної культури спостерігався при рН 10,0. Також було встановлено, що в мутантного варіанта дещо звужується температурний діапазон дії — від 10 до 60 °C (оптимум при 37–40 °C), тимчасом як у вихідної культури максимум активності був при 40–50 °C, а при 60 і 70 °C залишалося 87 і 32% від початкової активності, відповідно.

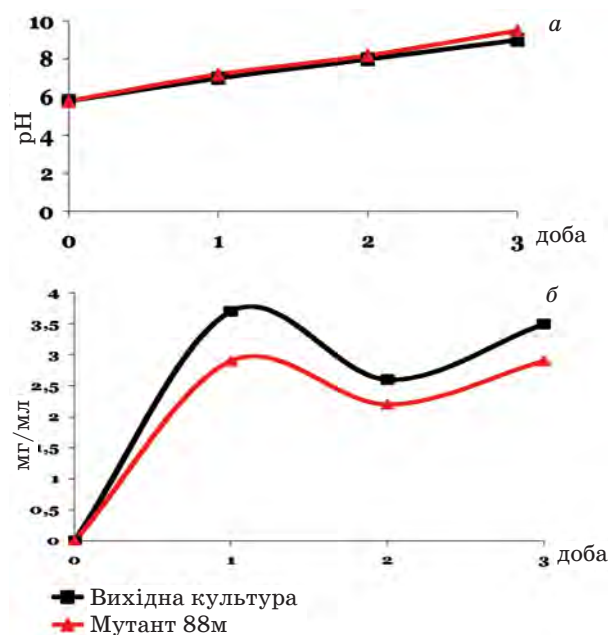


Рис. 3. Зміна рН у процесі культивування (а); накопичення протеїну в процесі культивування (б)

Відрізнялися препарати і за каталітичною активністю (рис. 6). Так, препарат мутантного варіанта з високою швидкістю гідролізував еластин і желатину, при цьому його активність щодо казеїну була майже в 2 рази нижчою за вихідний варіант. Дещо вищою (до 50–70%) була активність препарату 88м щодо інших протеїнових субстратів фібрину, гемоглобіну й колагену. Отримані нами дані можна було пояснити або змінами в регуляції синтезу еластаз мутантним варіантом і, відповідно, зростанням їх частки у пулі ензимів, які синтезує штам, або ж це могло бути наслідком структурних змін, що спричинило підвищення функціональної активності ензимів.

Під час очищення (рис. 7) комплексного ензимного препарату іонообмінною хроматографією на DEAE-TSK гелі було показано, що в ензимного комплексу мутантного

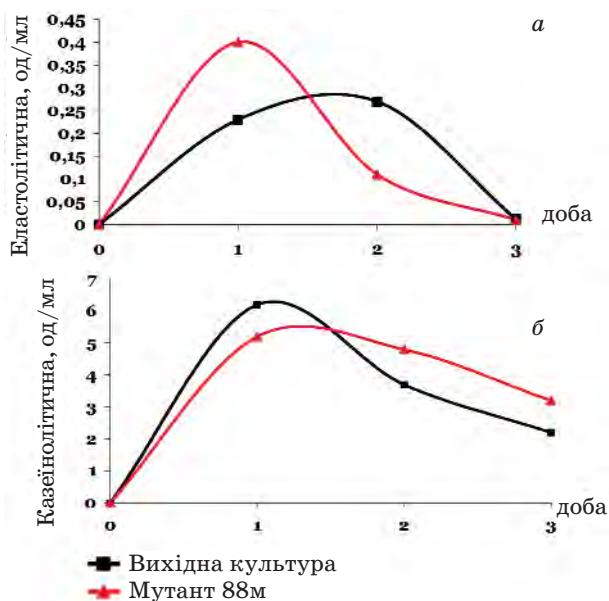


Рис. 4. Зміна еластазної та казеїнолітичної активності у процесі культивування

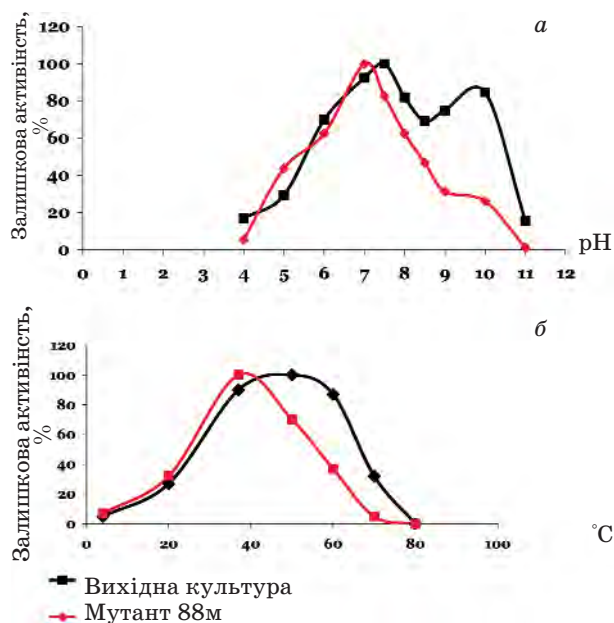


Рис. 5. Дослідження активності комплексних ензимних препаратів вихідної культури і мутантного варіанта (88м) від рН середовища та температури

варіанта зникає другий ензим з еластазною дією, який виходив у градієнті концентрацій від 0,5 до 0,7 М хлориду натрію (встановлена молекулярна маса для нього становить 22,7 кДа), а залишається лише один ензим з еластазною дією, який виходить до початку лінійного градієнта солі (молекулярна маса 28,7 кДа). При цьому також було встановлено, що вихід еластази у мутанта

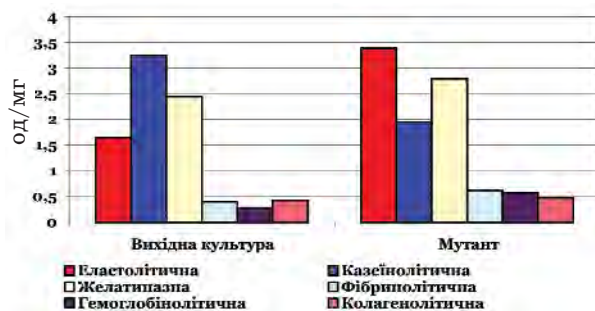


Рис. 6. Субстратна специфічність комплексних ензимних препаратів вихідної культури *Bacillus* sp. і мутантного варіанта 88м

зростав до 25%, на відміну від вихідної культури, у якій частка цього ензиму становила не більше 10%. Спектри каталітичної активності отриманого очищеного ензиму й ензиму вихідної культури збігалися (рис. 8), що може свідчити про те, що каталітична активність ензиму не змінилася. Тобто, очевидно, що в мутантного варіанта відбулися зміни в регуляції синтезу одного з ензимів, унаслідок чого зросла частка цього ензиму в пулі всіх екзоензимів культури, причому, найімовірніше, за синтез двох еластаз відповідають різні гени.

Таким чином, проведені дослідження показали перспективність отримання суперпродуцентів еластолітичних ензимів з культури *Bacillus* sp. за допомогою хімічного мутагену N-метил-N'-нітро-нітрозогуанідину. На прикладі одного з мутантів було проведено дослідження умов біосинтезу протеаз і встановлено, що мутантний варіант відрізняється від вихідної культури за динамікою синтезу еластолітичних ензимів. Одержаний очищений ензимний препарат також відрізнявся за залежністю активності від кислотності середовища й температури. Було показано, що мутант синтезує лише одну серинову протеазу з еластолітичною дією, що має молекулярну масу 28,7 кДа. При цьому синтез цього ензиму збільшується вдвічі порівняно з батьківським штамом.



Рис. 7. Іонообмінна хроматографія комплексного ензимного препарату мутантного варіанта 88м на TSK DEAE 650(M)

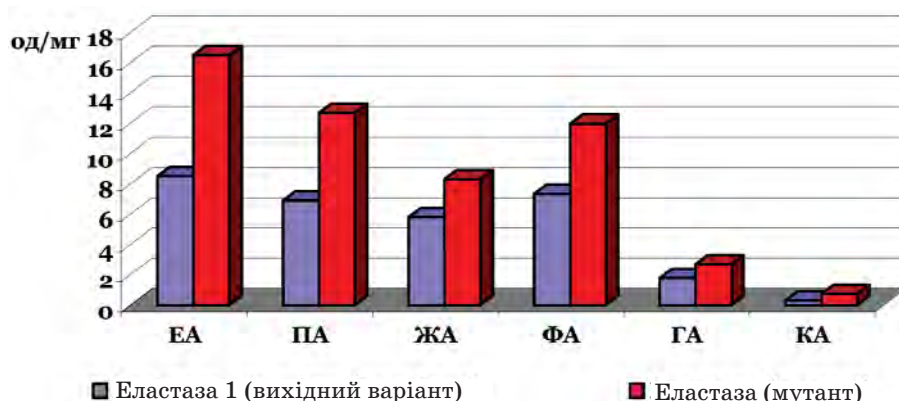


Рис. 8. Субстратна специфічність очищених ензимних препаратів еластази мутантного варіанта 88м і вихідної культури *Bacillus* sp.

ЛІТЕРАТУРА

1. Варбанець Л. Д., Шубчинська А. С., Нагорна С. С., Сафронова Л. А. Скринінг мікроорганізмів — продуцентів протеаз // Мікробіол. журн. — 2008. — Т. 70, № 1. — С. 3–9.
2. Бондарчук А. А., Ажицкий Г. Ю. Характеристика ферментного комплексу из *Bacillus mesentericus* // Там же. — 1981. — Т. 43, № 6. — С. 687–690.
3. Левішко А. С., Мацелюх О. В., Варбанець Л. Д. Очищення та фізико-хімічні властивості протеолітичного комплексу *Bacillus* sp. // Там само. — 2009. — Т. 71, № 1. — С. 6–15.
4. Петрова И. С., Винцюнайте М. Н. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения // Прикл. биохим. микробиол. — 1966. — Т. 2, № 1. — С. 322–327.
5. Шубчинська А. С., Мацелюх О. В., Варбанець Л. Д. Вплив різних джерел вуглецю і азоту на синтез протеолітичних комплексів *Bacillus circulans* 693, *Bacillus* sp. 27 та *Yarrowia lipolytica* 2061 // Укр. біохім. журн. — 2008. — Т. 80, № 3. — С. 131–139.
6. Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F. et al. Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. — The John Innes Foundation, Norwich, UK, 1985.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — V. 193, N 1. — P. 265–275.
8. Trombridg G. O., Moon H. D. Purification of human elastase // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. — 1972. — V. 141, N 3. — P. 928–931.

**ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТОВ *Bacillus* sp.
С ПОВЫШЕННЫМ СИНТЕЗОМ ЭЛАСТАЗЫ***Мацелюх Е. В.*Институт микробиологии и вирусологии
НАН Украины, Киев*E-mail: oivanko@yahoo.com*

Проведен химический мутагенез штамма-продуцента эластолитических энзимов *Bacillus* sp. при помощи N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина. Повышенная эластазная активность была выявлена у 2,1% из 1 000 исследованных мутантных вариантов, при этом она оставалась стабильной через 6 месяцев только у 7 вариантов. Уровень эластазной активности у отобранных вариантов был выше на 31–100% по сравнению с исходной культурой. Было установлено, что один из полученных мутантов *Bacillus* sp. 27 (88 м) отличается от исходного штамма по динамике синтеза энзимов и по таким физико-химическим показателям, как зависимость активности энзимного комплекса от кислотности среды и температуры. Было показано, что мутант синтезирует только одну сериновую протеазу с эластолитическим действием, которая имеет молекулярную массу 28,7 кДа. При этом синтез этого энзима увеличивается вдвое по сравнению с родительским штаммом.

Ключевые слова: *Bacillus* sp., эластаза, мутанты, N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин.

**OBTAINING OF MUTANTS OF *Bacillus* sp.
WITH ENHANCED ELASTASE
PRODUCTION***Matselyukh O. V.*Institute of Microbiology and Virology
of National Academy of Science of Ukraine,
Kyiv*E-mail: oivanko@yahoo.com*

Chemical mutagenesis of producer strain of *Bacillus* sp. 27 elastolytic enzymes was analysed using N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. 2.1% among a 1 000 of the investigated mutant variants shown a sign of elastase overactivity and only 7 variants proved to be stable during 6 months. Level of elastase activity for the selected variants was 31–100% higher as compared to the initial culture. It was found that one of the obtained *Bacillus* sp. 27 (88m) mutants was distinguished from the native culture in enzymes biosynthesis and in such physical and chemical indexes as enzyme complex dependence on pH and temperature of medium as well. It was shown that mutant 88m produced only one serine protease with elastolytic action which molecular mass was about 28,7 kDa. Synthesis of this enzyme was twice as much as in comparison with the native culture.

Key words: *Bacillus* sp., elastase, mutants, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.