

УДК579.22:579.69:577.152.1

Л.А. Жуковская, канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

(Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск);

Е.С. Судакова, студ. биологического факультета

(Белорусский государственный университет, Минск);

Т.В. Семашко, доц., канд. биол. наук, вед. науч. сотр.

(Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск)

ОСОБЕННОСТИ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *PAENARTHROBACTER AUREUS*, СИНТЕЗИРУЮЩЕГО ВНЕКЛЕТОЧНУЮ ХОЛЕСТЕРОЛОКСИДАЗУ

Синтез микробных ферментов в значительной степени зависит как от химических факторов (количества источника углерода и азота, ионов металлов, поверхностно-активных веществ в питательной среде), так и физических (температура, рН, время культивирования).

Холестеролоксидаза (ХО)(КФ 1.1.3.6.) – мономерный бифункциональный флавинадениндинуклеотид (ФАД) зависимый фермент, принадлежащий к классу оксидоредуктаз, которые специфично воздействуют на СН-ОН группы доноров с кислородом в качестве акцептора [1].

Известно, что для большинства бактериальных штаммов, продуцирующих ХО, оптимальная кислотность среды, при которой происходит максимальная продукция фермента, находится в промежутке 6,5-8,0, а оптимальная температура культивирования находится в диапазоне 28-39°C [2].

Ранее нами был проведен скрининг бактериальных штаммов, продуцирующих внеклеточные ХО, и отобраны наиболее активные по данному признаку культуры [3].

Цель работы – изучить влияние условий культивирования (начального рН питательной среды, температуры и времени культивирования) на рост и образование внеклеточной ХО *P.aureus*.

Глубинное культивирование *P.aureus* осуществляли с использованием мясо-пептонной питательной среды, содержащей 0,1% холестерина, начальными значениями рН 5,0-10,0, диапазоне температур 26-30°C в течение 48-96 ч. Активность внеклеточной ХО определяли спектрофотометрически [4]. Белок анализировали по методу Bradford [5], рН – потенциометрически.

Анализ полученных данных позволил установить, что активная кислотность питательной среды в процессе культивирования увеличивалась на 0,55-2,40 (таблица). Что касается количества биомассы, то наибольшее значение наблюдали при начальном рН питательной сре-

ды равном 9,0 (28,20 мг/мл), а наименьшее (16,71 мг/мл) при начальном рН 5,0. Максимальное количество накопленного белка по окончании культивирования было зафиксировано при рН 9,0 (11,03 мг/мл), а минимальное составило 5,57 мг/мл (рН 5,0).

Таблица 1 – Характеристика глубинного культивирования *Paenarthrobacter aureus*

Начальный рН	Конечный рН	Белок, мг/мл	Биомасса, мг/мл
5.0	7,40±0,22	5,57±0,17	16,71±0,50
6.0	8,05±0,24	5,62±0,17	22,25±0,68
7.0	8,90±0,27	5,72±0,17	23,89±0,72
8.0	9,20±0,28	7,76±0,23	24,47±0,73
9.0	9,55±0,29	11,03±0,33	28,20±0,85
10.0	9,70±0,29	7,02±0,21	25,34±0,76

Показано постепенное снижение количества внеклеточной ХО с увеличением значения начальной активной кислотности питательной среды (рис. 1).

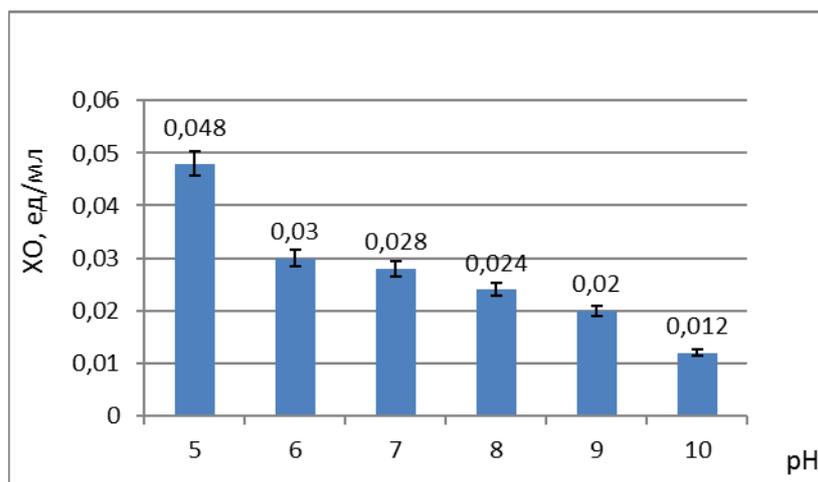


Рисунок 1 – Зависимость количества продуцируемой внеклеточной ХО от начального рН питательной среды у *Paenarthrobacter aureus*

Так, наибольшее значение ХО отмечено при рН 5,0 (0,048 ед/мл), минимальное – рН 10,0 (0,012 ед/мл).

При исследовании влияния температуры культивирования на образование ХО *P. aureus* установлено, что наибольшее количество внеклеточного фермента было при температуре 28°C (0,088 ед/мл), а наименьшее – 0,044 ед/мл при 26°C, что в 2 раза меньше относительно значения, зафиксированного при 28°C (рис. 2). На диаграмме, отражающей зависимость количества фермента от времени культивирования (рис. 2б), видно, что значения при 72 ч и 96 ч одинаковы (0,088 ед/мл), а при культивировании в течение 48 ч количество ХО ниже в 6,3 раза (0,014 е/мл).

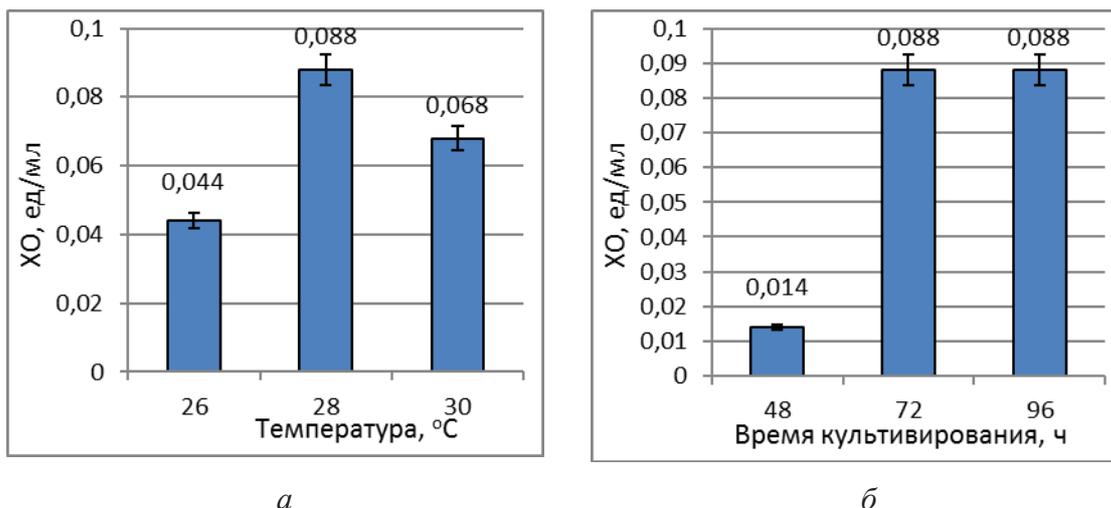


Рисунок 2 – Продуцирование внеклеточной ХО у *Paenarthrobacter aureus* в зависимости от температуры (а) и времени культивирования (в)

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что оптимальными условиями для роста и синтеза ХО *P.aureus* являются культивирование штамма в течение 72 ч при 28°C и начальном рН питательной среды 5,0.

ЛИТЕРАТУРА

1. Noriyuki, D. Characteristics and biotechnological applications of microbial cholesterol oxidases / D. Noriyuki // *Appl Microbiol Biotechnol.* –2009. –Vol. 83. –P. 825-837.
2. Moradpour, Z. Isolation, molecular identification and statistical optimization of culture condition for a new extracellular cholesterol oxidase-producing strain using response surface methodology / Z. Moradpour, A. Ghasemian, A. Safari, M. Mohkam, Y. Ghasemi // *Ann Microbiol.* – 2013. –Vol. 63. –P. 941-950.
3. Жуковская Л.А., Семашко Т.В., Мунтянова М.В. Поиск новых штаммов бактерий, синтезирующих внеклеточные холестеролоксидазы веществ // *Микробные биотехнологии: фонд. и прикл. аспекты: матер. XII межд. конф., посвящ. 55-летию Ин-та микр-ии НАН Беларуси, Минск, 7–11 июня 2021 г.* – Минск, 2021 – С. 78–79.
4. Enzymatic Assay of Cholesterol Oxidase [электронный ресурс]. – 2020. – Режим доступа: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-cholesterol-oxidase>. – Дата доступа: 01.04.2022.
5. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Annal. Biochem.*, 1976. –Vol. 72. –P. 24-25.