

УДК 604.4

А.Ю. Шпачук, Н.Д. Пономарёв,

Е.Н. Хрячкова, В.А. Колодязная

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет

Санкт-Петербург, Российская Федерация

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ СИНТЕЗА
ХОЛЕСТЕРОЛОКСИДАЗЫ STREPTOMYCES LAVENDULAE
ОТ ИСТОЧНИКОВ АЗОТА В СОСТАВЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ
СРЕДЫ**

***Аннотация.** Холестеролоксидаза – фермент, катализирующий превращение холестерина и применяемый в ряде отраслей. В настоящее время не производится на территории стран СНГ. Как часть решения данной проблемы предлагается комплексное исследование, отражающее зависимость активности фермента от источников азота в питательной среде.*

A.Y. Shpachuk, N.D. Ponomarev,

E.N. Khryachkova, V.A. Kolodyazhnaya

St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University

St. Petersburg, Russian Federation

**INVESTIGATION OF THE DEPENDENCE OF STREPTOMYCES
LAVENDULAE CHOLESTEROL OXIDASE SYNTHESIS ON
NITROGEN SOURCES IN THE NUTRIENT MEDIUM**

***Abstract.** Cholesteroloxidase – enzyme that catalyzes transformation of cholesterol and is used in a number of industries. Currently, it is not produced in the territory of the CIS countries. As part of the solution to this problem, a comprehensive study is proposed that reflects the dependence of enzyme activity on nitrogen sources in the nutrient medium.*

Введение. Холестеролоксидаза – фермент из класса оксидоредуктаз, катализирующий превращение холестерина в холестер-4-ен-3-он с образованием перекиси водорода. Находит применение в сельском хозяйстве, производстве лекарственных веществ стероидной природы и в рамках определения содержания холестерина в пищевых продуктах, а также в крови [1]. Последнее особенно значимо, так как определение липидного профиля крови лежит в основе профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, которые, в свою очередь, признаются наиболее распространённой причиной человеческих смертей по всему миру и в, частности, в Российской Федерации и Республике Беларусь [2].

Холестеролоксидаза синтезируется только микроорганизмами (в основном, бактериями). В настоящее время промышленное производство данного фермента отсутствует на территории стран СНГ, так что в этом смысле данные государства остаются импортозависимыми. Для решения этой проблемы в НОЦ биотехнологии и биоинженерии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета была разработана технология получения данного фермента с использованием *Streptomyces lavendulae* в качестве продуцента. Однако технология имела ряд проблем, часть из которых связана с источниками азота в составе питательной среды.

Материалы и методы. Все эксперименты по культивированию в качалочных колбах велись на качающей платформе в течение 48 часов при 28°C и скорости качания 210 об/мин. Все эксперименты по культивированию проводились в трёх повторностях. Измерение активности фермента проводилось после экстрагирования из мицелия с помощью раствора твина методом Ричмонда.

Эксперименты по подбору наиболее подходящего источника органического азота для культивирования продуцента осуществлялись в качалочных колбах с объёмом питательной среды 150 мл. В составе питательной среды было 1,5 г глюкозы, 0,3 г NH_4NO_3 , 0,3 г CaCO_3 и 1 г исследуемого источника органического азота.

Часть экспериментов проводилась при культивировании в лабораторном ферментаторе Sartorius Biostat A, оснащение которого позволяет поддерживать pH на постоянном уровне и контролировать количество пены. Объём питательной среды в проведённых экспериментах составлял 1 л, компоненты питательной среды соответствовали обозначенному выше перечню, а их количество было пропорционально увеличению объёма среды. Условия культивирования были следующими:

- скорость перемешивания – 240 об/мин,
- pH 7,0,
- пеногаситель – подсолнечное масло,
- объёмная скорость подачи воздуха – 6,3 л/мин.

Результаты. Первоначально в качестве источника органического азота применялись пекарские дрожжи спрессованные. Однако данный субстрат не используется в промышленности и требует особого подхода в приготовлении. Поэтому была поставлена задача по смене источника органического азота. В ходе проводимых экспериментов наиболее подходящим источником азота оказался дрожжевой автолизат (см. табл. 1).

Таблица 1 Зависимость активности холестеролоксидазы от источника органического азота

Используемый источник органического азота	Активность, ЕД
Дрожжевой экстракт	0
Дрожжевой гидролизат	$0,08 \pm 0,02$
Дрожжевой автолизат	$0,42 \pm 0,09$

Технология с применением дрожжевого автолизата была затем масштабирована на условия лабораторного ферментатора, где были получены удовлетворительные значения активности (см. рис. 1).

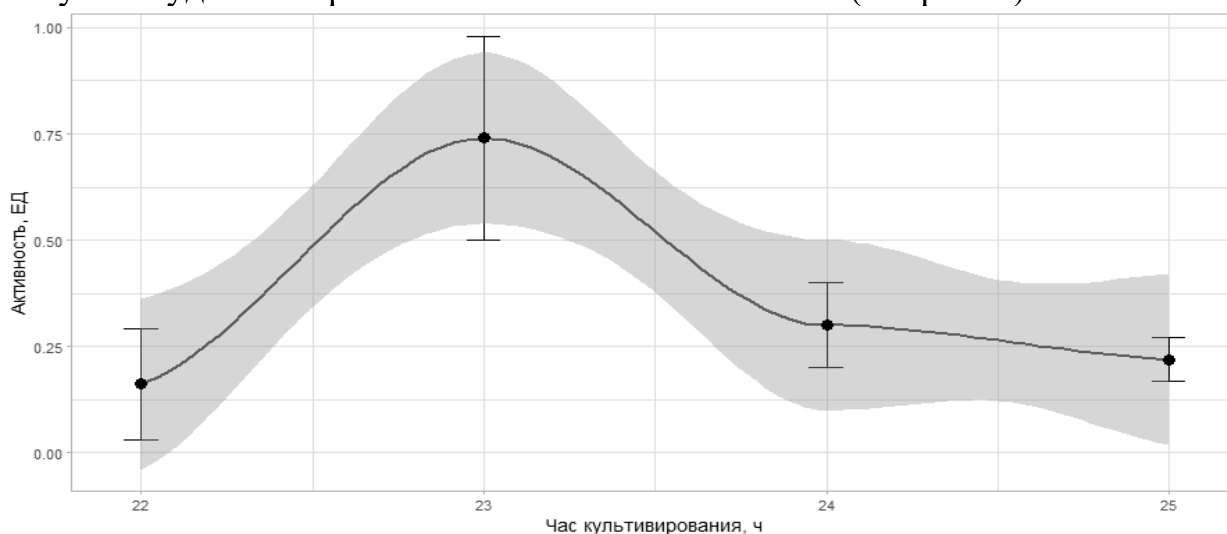


Рисунок 1 - Зависимость активности холестеролоксидазы от времени культивирования в лабораторном ферментаторе

Следующим этапом осуществлялись эксперименты в соответствии с методом Плакетта-Бермана [3] при варьировании 7 параметров (см. табл. 2).

- x_1 – содержание дрожжевого автолизата, уровень (-) = 0,5г на 150 мл, уровень (+) = 2 г на 150 мл,
- x_2 – содержание глюкозы (моногидрат), уровень (-) = 1,65г на 150 мл, уровень (+) = 3,3 г на 150 мл,
- x_3 – наличие добавок стерильной глюкозы на 6-7 час культивирования уровень (-) = отсутствие долива, уровень (+) = 5 мл 10% раствора на 150 мл,
- x_4 – время культивирования, уровень (-) = 18 часов, уровень (+) = 24 часа,
- x_5 – добавки витамина В6, уровень (-) = нет добавок, уровень (+) = 5мг на 150 мл,
- x_6 – содержания нитрата аммония, уровень (-) = 0,3г на 150 мл, уровень (+) = 0,6г на 150 мл,

– x_7 – содержание мела, уровень (-) = 0,3 г на 150 мл, уровень (+) = 0,6 г на 150 мл.

–

Таблица 2- Матрица плана, составленная по методу Плакетта-Бермана

№ эксперимента	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7
1	+	+	+	-	+	-	-
2	-	+	+	+	-	+	-
3	-	-	+	+	+	-	+
4	+	-	-	+	+	+	-
5	-	+	-	-	+	+	+
6	+	-	+	-	-	+	+
7	+	+	-	+	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-	-

В ходе статистической обработки выяснилось, что значимыми являются следующие факторы: время культивирования, содержание источника органического азота, содержание глюкозы. На основании полученных данных была получена регрессионная модель с коэффициентом детерминации $R^2 = 0,991$. Её формула:

$$y = 0,299 - 0,315x_1 - 0,03x_2 + 0,029x_3.$$

где:

x_1 - содержание дрожжевого автолизата, г;

x_2 - содержание глюкозы (моногидрат), г;

x_3 – время культивирования, ч.

Как видно из приведённой формулы зависимость от содержания источника органического азота обратно-пропорциональная. Что, вероятно, не отражает реальной связи. Кроме того, проводимые ранее исследования [4] явствуют, что фактор содержания неорганического азота оказывает значимое влияние на активность фермента. Эти противоречия привели к необходимости проведения дополнительных экспериментов для проверки гипотезы о наличии взаимодействия между факторами содержания органического и неорганического азота, а также гипотезы о нелинейной зависимости активности фермента от содержания дрожжевого автолизата. Опыты представляли собой полнофакторный эксперимент с двумя уровнями и центральной точкой. Содержание NH_4NO_3 варьировалось от 0,15 г на 150 мл до 0,3 г, а дрожжевого автолизата – с 0,4 до 1,0 г (см. табл. 3)

Таблица 3.

Номер эксперимента	Содержание дрожжевого автолизата	Содержание NH_4NO_3	Активность, ЕД
1	0	0	1,222
2	-	-	1,242

3	-	+	0,491
4	+	-	0,065
5	+	+	0,1775

Статистический анализ полученных данных показал отсутствие зависимости между активностью фермента и независимыми переменными.

Заключение. Таким образом, был проведён ряд экспериментов, позволивших подобрать более подходящий источник органического азота с переносом технологии на условия лабораторного ферментатора. Были найдены значимые для дальнейшей оптимизации технологии факторы с помощью метода Плакетта-Бермана. Наконец, было исследовано взаимодействие между факторами содержания NH_4NO_3 и содержания дрожжевого автолизата. Впрочем, последнее требует дальнейших изысканий.

Список использованных источников

1. Devi S., Kanwar S. Cholesterol Oxidase: Source, Properties and Applications. // Insights in Enzyme Research. 2018. № 1 (01).
2. Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates> (дата обращения: 01.04.2025).
3. Plackett R. L., Burman J. P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments // Biometrika. 1946. № 4 (33). С. 305–325.
4. Королева А. А., Булдакова Т. В. Биосинтез Холестеролоксидазы Культурой *Streptomyces Lavendulae* При Варьировании Азотсодержащих Органических Компонентов Питательной Среды Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2016. С. 364–368.

УДК 667.622.1+546.723

**Л. С. Ещенко, Р. А. Воронцов, А. С. Тихонов,
Ю. А. Урбшас**

Белорусский государственный технологический университет
Минск, Республика Беларусь

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА ТЕРМОЩЕЛОЧНОЙ КОНВЕРСИИ МОНОГИДРАТА СУЛЬФАТА ЖЕЛЕЗА