УДК 579.87.017.7:577.114

ВПЛИВ ЛІПОПЕПТИДНИХ БІОПАР ШТАМУ *B. subtilis* С-14 НА ПРОНИКНІСТЬ МЕМБРАН ТА АКТИВНІСТЬ ТРАВНИХ ФЕРМЕНТІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

О. М. Шульга, О. В. Карпенко*, З. Г. Гамкало**, О. С. Грабовська****

*Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка НАН України
**Львівський національний університет ім. Івана Франка
***Інститут біології тварин НААН України

Вивчено вплив пептидоліпідних поверхнево активних сполук (біоПАР) штаму B.subtilis С-14 *на процеси травлення та структурно-функціональний стан червоних клітин крові великої рогатої худоби. Додавання біоПАР до суспензії еритроцитів бичків підвищує проникність їх мембран. У модельних експериментах встановлені особливості впливу мікробних поверхнево-активних сполук на ензиматичну активність (протеазну, ліпазну, амілазну) мікроорганізмів-симбіонтів жуйних.*

Отримані результати створюють перспективи для застосування мікробних поверхнево-активних препаратів і розробки нових біотехнологій підвищення ефективності процесів травлення сільськогосподарських тварин та отримання високоякісної тваринницької продукції.

Ключові слова: БІОПАР, ПЕПТИДОЛІПІДИ, ШТАМ *B.subtilis* С-14, ПРОТЕАЗА, ЛІПАЗА, АМІЛАЗА, ЖОВЧ, РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ.

Розроблення регуляторів фізіолого-біохімічних процесів в організмі сільськогосподарських тварин є важливим способом підвищення ефективності існуючих технологій тваринництва. Загальновідомо, що речовини гормональної природи, більшість з яких є потужними стимуляторами росту і розвитку тварин, що широко застосовували свого часу у тваринництві, характеризуються побічними негативними ефектами: залишкові кількості цих сполук або їх метаболітів у продуктах харчування негативно впливають на організм людини.

Принципово новий підхід до управління процесами біологічної продуктивності сільськогосподарських тварин та якістю продукції ґрунтується на застосуванні нового типу регуляторів — поверхнево активних речовин (ПАР) [1, 2]. Важливо, що вони не діють як антагоністи або синергісти природних регуляторів організму тварин — гормонів, і тому не спричиняють дисгормональних станів і пов'язаних з ними наслідків. Дія поверхнево активних препаратів спрямована на мембранні процеси у клітинах організму продуктивних тварин. З огляду на дифільну (білково-ліпідну) структуру клітинних мембран, саме ПАР, як амфіфільні молекули, є найбільш функціонально компліментарними структурами, які можуть регулювати або модифікувати біологічні мембрани [3, 4].

Біогенні ПАР (біоПАР) представляють значний інтерес для досліджень з фізіології сільськогосподарських тварин, зокрема, жуйних, оскільки вони, концентруючись на межі розділу фаз, можуть змінювати поверхневий натяг рідини рубця і впливати на низку фізико-хімічних і біохімічних процесів в організмі.

Відомо, що в організмі тварин функціонують біогенні ПАР, які входять до складу жовчі, що секретується гепатоцитами [5]. Жовч містить глікохол й таурохолеву кислоту

(жовчні кислоти), які здебільшого зв'язані з таурином і гліцином; вільні кислоти присутні у невеликих кількостях. За участю жовчі відбуваються процеси емульгування жирів, активування ліпази. Вони також сприяють всмоктуванню продуктів гідролізу жирів, посиленню дії ферментів підшлункового і шлункового соків, гідролізу поживних речовин корму, підвищенню тонусу і перистальтики кишківника, виведенню з організмів продуктів обміну тощо. Про важливість регуляторних функцій жовчі свідчить те, що у тонкому кишківнику до 95% жовчних кислот активно реабсорбуються, по системі ворітної вени повертаються до печінки і знову надходять до складу жовчі (печінково-кишковий кругообіг). За добу цей цикл повторюється 6-10 разів.

Проте, на сьогоднішній день вплив мікробних і рослинних ПАР на обмін речовин жуйних тварин зовсім не враховується при аналізі метаболічних процесів у рубці, тобто органі, на який не поширюється вплив ендогенного ПАР — жовчі. Це пов'язано з відсутністю наукової інформації про якісні та кількісні параметри синтезу поверхнево-активних речовин мікроорганізмами рубця, структури їх молекул, ролі в регуляції мікробіологічних процесів у системі «клітина - клітина» і «рубець - кров».

З іншого боку, такі унікальні властивості ПАР, як емульгування жирів і вуглеводнів, регуляція змочування і реологічних властивостей розчинів, зниження поверхневого натягу, вплив на капілярні процеси, підвищення проникності клітинних мембран створюють перспективу застосування цих речовин у препаративних формах сучасних засобів менеджменту у землеробстві і тваринництві [2, 4, 6]. Про високу ефективність поверхнево-активних речовин, зокрема біоПАР, свідчить комплекс досліджень, виконаних раніше у відділі екології Інституту землеробства і тваринництва західного регіону УААН [7, 8], особливо у зв’язку з запобіганням процесам біогідрогенізації поліненасичених жирних кислот кормів, що значно погіршує якість тваринницької продукції, її біологічну активність.

Біогенні поверхнево активні продукти за своєю ефективністю перевершують хімічні ПАР, разом з тим, біоПАР є нетоксичними, біодеградабельними і екологічно безпечними [4, 9]. Таким чином, розроблення принципово нових біостимуляторів на основі біогенних ПАР є особливо актуальною проблемою.

Метою роботи було дослідження впливу препарату поверхнево активних пептидоліпідів штаму *B.subtilis* С-14 на ферментативну активність мікроорганізмів рубця жуйних тварин та проникність мембран еритроцитів.

Матеріали і методи

Як продуцент біоПАР використовували штам *B. subtilis* С-14 з колекції мікроорганізмів Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ НАН України. Культуру вирощували на синтетичному поживному середовищі [10] за умов аерації (ротаційна качалка, 200 об/хв) при 28–30 °С протягом 3-х діб. Як джерело вуглецю застосовували сахарозу (2 %). БіоПАР ліпідної природи екстрагували із супернатанту культуральної рідини сумішшю хлороформ:метанол (2 : 1). Якісний аналіз і препаративне виділення пептидоліпідів здійснювали за методом, наведеним у роботі [11]. Активність ферментів визначали за методами [11,12,13]. В експериментах застосовували рідину рубця і цільну кров, відібрану від 9-місячних бичків, утримуваних на основному раціоні. Проникність еритроцитарних мембран визначали за допомогою методу автоматичної реєстрації кінетики гемолізу, розробленого Гамкалом З. Г [15–17].

Результати й обговорення

У модельних експериментах з використанням рідини рубця бика показано, що поверхнево-активні пептидоліпіди суттєво впливають на досліджувані мікробіологічні процеси (протеолітичну, ліполітичну й амілолітичну активності).

У таблиці 1 наведено результати досліджень впливу біоПАР штаму *B.subtilis* С-14 на протеолітичну активність рідини рубця. У цьому модельному експерименті, для порівняння ефекту різних біоПАР, використано жовч.

Отримані дані показують, що пептидоліпіди за концентрації 0,030 % підвищують активність протеолітичних ферментів у 2,5 раза, порівняно з контролем. Жовч інакше впливає на вказані ферменти: з підвищенням її концентрації активність протеолізу знижується. Ймовірно, різноспрямованість дії двох досліджених біоПАР зумовлена особливістю їх структурно-функціонального впливу як на мікроорганізми в цілому (ефект обволікання) так і на поверхневі структури (мембранні і примембранні утворення). Необхідно також враховувати особливості солюбілізаційної здатності вивчених поверхнево-активних речовин, що зумовлює біодоступність поживних речовин середовища інкубування. Варто врахувати, що специфічність дії жовчі як емульгатора спрямована переважно на емульгування гідрофобних метаболітів.

Таблиця 1

Вплив поверхнево-активних пептидоліпідів штаму *B.subtilis* С-14 на протеолітичну активність рідини рубця бика (*in vitro*)

Концентрація ПАР, %	Протеолітична активність, од. активності/мл	
	біоПАР	Жовч
Контроль (дистильована вода)	0,713	0,713
0,001	0,715	0,580
0,015	1,230	0,430
0,030	1,750	0,420
0,050	1,730	0,350

Результати вивчення впливу поверхнево активних пептидоліпідів штаму *B. subtilis* С-14 та жовчі на амілолітичну активність рідини рубця бика наведено у таблиці 2. Показано, що додавання до середовища біоПАР (0,030 %) спричинило підвищення активності амілази на 11%. Жовч також мала стимулювальний вплив на даний фермент, але за її концентрації 0,05% спостерігалося його інгібування. Високу активність амілолітичного процесу при додаванні жовчі за концентрації 0,001–0,30 % можна пояснити наявністю у жовчі амілази, що підтверджується літературними даними [5].

Таблиця 2

Вплив поверхнево-активних пептидоліпідів штаму *B.subtilis* С-14 на амілолітичну активність рідини рубця бика (*in vitro*)

Концентрація ПАР, %	Амилолітична активність, од. активності/мл	
	біоПАР	Жовч
Контроль (дист. вода)	0,375	0,375
0,001	0,379	0,482
0,015	0,408	0,445
0,030	0,415	0,391
0,050	0,412	0,320

Особливе значення для характеристики ефективності поверхнево-активних сполук має їх вплив на ліполітичну активність біологічних систем (табл. 3). Встановлено, що біоПАР штаму *B. subtilis* С-14 підвищували активність ліпаз рідини рубця бика приблизно в

2,2, а препарат жовчі — в 2,7 раза, що також може бути пов'язано з власною ферментативною (ліполітичною) активністю жовчі [5].

Подібність впливу мікробних ПАР і жовчі на активність ліпази свідчить про універсальність механізму регулювання процесів жирового обміну поверхнево активними речовинами різного походження, що полягає, ймовірно, у зміні гідрофільно-гідрофобних властивостей середовища, а також напряму метаболічних потоків водо- і жиророзчинних компонентів.

Таблиця 3

Вплив поверхнево активних пептидоліпідів штаму *B. subtilis* С-14 на ліполітичну активність рідини рубця бика (*in vitro*)

Концентрація ПАР, %	Ліполітична активність, од. активності/мл	
	біоПАР	Жовч
Контроль (дист. вода)	0,095	0,095
0,001	0,100	0,170
0,015	0,210	0,230
0,030	0,190	0,170
0,050	0,120	0,260

З метою оцінки можливої гемолітичної дії нових біоПАР досліджено вплив поверхнево-активних пептидоліпідів штаму *B.subtilis* С-14 на кінетику гемолізу еритроцитарної популяції та їх сумарну резистентність, яка, в цілому, відображає проникність еритроцитарних мембран. Отримані результати представлені у таблиці 3.

Встановлено, що досліджені біоПАР тільки за концентрації (1×10^{-1} мг%) суттєво знижують резистентність еритроцитарних мембран (на 31%), тоді як за інших концентрацій цей показник змінюється на 5-15%. Повний гемоліз еритроцитів під дією пептидоліпідів штаму *B.subtilis* С-14 виявлено лише за концентрації 50 мг%.

Таблиця 4

Вплив поверхнево активних пептидоліпідів штаму *B. subtilis* С-14 на сумарну резистентність еритроцитів бика

Концентрація ПАР, мг %	Сумарна резистентність эритроцитів,	
	біоПАР	Жовч
Контроль (дист. вода)	398,80	398,80
1×10^{-1}	274,75	гемоліз
1×10^{-2}	379,00	гемоліз
1×10^{-3}	370,00	146,80
1×10^{-4}	365,00	368,20
1×10^{-5}	365,00	371,80
1×10^{-6}	343,00	374,50
1×10^{-7}	371,00	346,50
1×10^{-8}	343,80	361,20
1×10^{-9}	342,80	376,20

Жовч в модельному експерименті спричиняла сильний гемолітичний вплив, внаслідок чого тільки за концентрації жовчі 1×10^{-3} мг% вдалося зареєструвати частину червоних клітин крові, мембрани яких не були дезінтегровані. Зниження сумарної резистентності еритроцитарної популяції на 80 % спостерігалося при використанні жовчі за концентрації 1×10^{-4} мг%.

Одержані результати свідчать, що ліпопептидні ПАР в пропонованих дозах, при своїй високій ефективності, практично не руйнують червоні клітини крові, що вказує на їх низьку токсичність.

Висновки

Поверхнево активні пептидоліпіди штаму *B. subtilis* С-14, залежно від концентрації, стимулюють протеолітичну (в 1,7–2,5 раза), амілолітичну (в 1,08–1,6 раза) і ліполітичну активності (в 1,05–2,2 раза) мікроорганізмів рубця бика і не порушують проникність еритроцитарних мембран.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати показують перспективність застосування біоПАР, що синтезуються штамом *B. subtilis* С-14, як поліфункціонального регулятора рубцевого травлення сільськогосподарських тварин.

A. Shulga, E. Karpenko, Z. Hamkalo, O. Grabovska

EFFECT OF LIPOPEPTID BIOSURFACTANTS OF STRAIN *B. subtilis* C-14 ON THE ACTIVITY OF DIGESTIVE ENZYMES OF CATTLE

S u m m a r y

Influence of lipopeptid surface active compounds (biosurfactants) of strain B.subtilis C-14 on the processes of digestion in cattle has been studied. Complex research on the cellular level (erythrocyte membranes) have showed that biosurfactants increase the permeability of erythrocyte membranes. The main features of the influence of microbial surfactants on enzymatic activity (protease, lipase, amylase) of symbiotic microorganisms were determinate. These results create the prospect of application of microbial surface active agents for the development of new technologies to improve the efficiency of the digestive processes of farm animals and receive of high quality products.

А. Н. Шульга, Е. В. Карпенко, З. Г. Гамколо, А. С. Грабовская

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПЕПТИДНОГО БИОПАВ ШТАММА *B.subtilis* С-14 НА АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНІХ ФЕРМЕНТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

А н н о т а ц и я

Изучено влияние пептидолипидных поверхностно-активных соединений (биоПАВ) штамма B. subtilis С-14 на процессы пищеварения крупного рогатого скота. Комплекс исследований на клеточном уровне (мембраны эритроцитов) показал, что биоПАВ повышают проницаемость мембран эритроцитов. Установлены особенности влияния микробных поверхностно-активных соединений на энзиматическую активность (протеазную, липазную, амилазную) микроорганизмов-симбионтов. Полученные результаты создают перспективу применения микробных поверхностно-активных препаратов для разработки новых технологий повышения эффективности процессов пищеварения сельскохозяйственных животных и получения высокоэффективной продукции.

1. *Черняева Л. Е.* Гидрохимия синтетических ПАВ / Черняева Л. Е., Черняев А. М., Шаманаев Ш. Ш. — Л. : Гидрометеоиздат, 1982. — 142 с.

2. *Dolina T.* Feluleaktiv anyzglok es gzyartaguk fejlodesse az utobbi evtizendben / Dolina T., Dobozy O. // Magyar Kemikusok Zapja. — 1976. — V. 31, N. 1. — P. 42–52.

3. *Carrillo C.* Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin / Carrillo C., Teruel J. A., Avanda F. J. // Biochemica et Biophysica Acta. — 2003. —V. 1611. — P. 91–97.

4. *Волощенко О. И.* Генетическое значение ПАВ / Волощенко О. И., Мудрый И. В. — Киев : Здоровье, 1991. — 174 с.

5. *Ганиткевич Я. В.* Роль желчных кислот в физиологии и патологии организма / Ганиткевич Я. В. — Киев : Наукова думка, 1980. — 100 с.

6. *Desai J. D.* Microbial production of surfactants and their commercial potential / Desai J. D., Bannat I. M. // Microbiology and Molecular Biology reviews. — 1997. — V. 61, N 1. — P. 47–64.

7. *Гамкало З. Г.* Біогенні поверхнево-активні речовини як важливий фактор регуляції метаболізму у сільськогосподарських тварин / Гамкало З.Г., О. Р. Длябога, М. І. Теслюк, О. С. Грабовська. // Наук.забезпеч. АПК західного регіону Україн. — Львів, 1993. — С. 90–91.

8. Гамкало З.Г. Теслюк М.І., Чукур С.Б. Мікробні поверхнево-активні речовини (МПАР) та їх вплив на організм бичків : Тез. доп. міжнар. конф. «Біологічні основи живлення сільськогосподарських тварин» / Гамкало З. Г. Теслюк М. І., Чукур С. Б. — Львів, 1998. — С.6–7.

9. *Gutnick D.* Perspectives on microbial surfactants — Resources, conservation and Recycling / Gutnick D., Minas W. — 1996. — V.18. — P. 41–57.

10. *Шульга А. Н.* Метод определения содержания анионогенных поверхностно-активных пептидолипидов бактериального происхождения / Шульга А. Н., Карпенко Е. В., Елисеев С. А. // Микробиол. журн. — 1993. — Т. 55, №1. — С. 85–88.

11. *Кучер Р. В.* Поверхностно-активные пептидолипиды куьлтуры *Bacillus sp.* : докл. АН УССР. / Кучер Р. В., Шульга А. Н., Елисеев С. А., та ін. — 1990. — № 9. — С. 40–42. — (Сер. Б. геол., хим. и биол. Науки).

12. Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности. ГОСТ 20.264.2-88.

13. Препараты ферментные. Методы определения амилолитической активности. ГОСТ 20.264.4-89.

14. *Отто Р.* Модифицированный метод определения липолитической активности / Отто Р., Ямада И. // Лабораторный практикум по технологи ферментных препаратов. — Москва : Легкая пищевая промышленность, 1982. — С. 75.

15. *Гамкало З. Г.* Поверхнево-активні речовини як регуляторний фактор у жуйних : тез. доп. Всеукр. конф. з фізіології і біохімії тварин / Гамкало З. Г., Грабовська О. С., Длябога О. Р. — Львів, 1994.

16. *Гамкало З. Г.* Вплив поверхнево-активних речовин (ПАР) на міклофлору рубця молодняка бичків : тез. доп. Всеукр. конф. з фізіології і біохімії тварин / Гамкало З. Г., Теслюк М. І., Бобрушко В. В. та ін. — Львів, 1994.

17. *Гамкало З. Г.* Поверхнево-активні речовини (ПАР) як регулятори фізико-хімічних процесів в організмі жуйних : тез. доп. міжнар. конф. «Біологічні основи живлення сільськогосподарських тварин» / Гамкало З. Г. — Львів, 1998. — С.5–6.

Рецензент: Туровський А. А., д.х.н., проф., пров. науковий співробітник відділу хімії і біотехнології ГК Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л. М. Литвиненка НАН України.