

А.И. Осадчая, Л.А. Сафронова, Л.В. Авдеева, В.М. Иляш

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, ГСП, Д 03680, Украина, тел. +38(044) 526 24 09,
e-mail: safronova_larisa@ukr.net

СПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* ГИДРОЛИЗОВАТЬ КСИЛАН

*Исследована способность гидролизовать сложноструктурный ксилан у 353 штаммов бактерий рода *Bacillus*, относящихся к 23 видам. Показано, что эта способность достаточно широко распространена среди 207 штаммов микроорганизмов этого рода, что составило 58,6% от всех исследованных. Среди них доминировали штаммы видов *B. subtilis* (111 штаммов из 228) и *B. megaterium* (11 штаммов из 13). Способность гидролизовать ксилан также обнаружена у штаммов видов *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. species*, *B. oligonitrophilus*. Штаммы видов *B. circulans*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B.adius*, *B. bombycis*, *B. lentus* и *B. pulvifaciens* не гидролизуют ксилан. Установлены не только видовые, но и штаммовые различия.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: ксиланазы, бактерии рода *Bacillus*.

В природных растительных материалах сложная по структуре целлюлоза обычно связана со многими другими углеводными соединениями: гемицеллюлозой, пектином, лигнином, крахмалом. Гемицеллюлозы, в частности, ксиланы, как и целлюлоза, относятся к основным компонентам клеточной стенки растительных материалов, их содержание в них составляет обычно 20–30%, а в ряде случаев и больше — 34–41% (кукурузная кочерыжка, солома, подсолнечная лузга, семена риса, ржи, сои, гороха, древесина разных пород). По современным представлениям через разные по структуре ксиланы осуществляется связь между целлюлозой и тяжело разлагающимся лигнином в растительных отходах [2].

Способность к образованию ферментов, расщепляющих не только целлюлозу, но и ксиланы, которыми богаты разнообразные сельскохозяйственные растительные отходы, более широко распространена среди грибов и актиномицетов, менее — среди бактерий. Ксиланазы обнаружены у бактерий рода *Bacillus* и обладают большей молекулярной массой, чем из грибов, и нередко более активны [4–7, 9]. Как возможные продуценты гидролитических ферментов эти микроорганизмы изучены значительно меньше, чем грибы, между тем широкое распространение их в природе и способность расщеплять такие труднодоступные соединения как ксиланы свидетельствуют о том, что бациллы обладают богатым набором ферментных систем и многие из них могут быть промышленно значимыми, а значит перспективными в будущем [8, 10]. В связи с изложенным, большой научный интерес и важное практическое значение представляет поиск активных штаммов среди бактерий рода *Bacillus* как продуцентов ксиланаз, которые могут быть использованы в сельском хозяйстве, в фармацевтической и пищевой промышленности.

Целью настоящей работы явился скрининг продуцентов ксиланаз и изучение их активности среди штаммов разных видов бактерий рода *Bacillus*.



Материалы и методы

В работе использованы 353 штамма бактерий рода *Bacillus*, относящихся к 23 видам, из коллекции культур отдела антибиотиков ИМВ НАН Украины.

Бактерии выращивали в течение 2-х суток при 37 °С в чашках Петри на агаризованной среде следующего состава (в г/л): цитрат натрия — 1,29; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 4,75; KH_2PO_4 — 9,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,18, которую использовали для первичного отбора ксиланазоактивных штаммов. В качестве источника углерода использовали ксилан овса [фирма Fluka, Германия] в концентрации 1%.

Отбор активных штаммов вели по зонам просветления ксилана, которые проявлялись на 2-е сутки инкубирования вокруг выросших колоний бактерий и отчетливо визуализировались после прокрашивания среды красителем конго рот (0,1%). По диаметру зон судили о способности культур разлагать ксилан. Активность ксиланаз (в ед/мл) определяли титровальным методом по количеству образующихся при ферментативном гидролизе 1%-ного ксилана в 0,05 М цитратно-фосфатном буфере (рН 5,0) редуцирующих сахаров (ксилозы) [3].

Активность эндоглюканызы и β -глюкозидазы определяли по количеству образующейся при их гидролизе глюкозы по предварительно построенным калибровочным кривым [3]. Содержание глюкозы находили с помощью 3,5-динитросалициловой кислоты [3].

Результаты и их обсуждение

Изучение ксиланазной активности бактерий проводили поэтапно. Первый этап работы заключался в качественном отборе штаммов, способных гидролизовать ксилан. Большинство культур (207 штаммов из исследованных — 58,6% от общего числа штаммов) образовывали зоны гидролиза ксилана разного диаметра: 87 штаммов из них (42%) — зоны диаметром от 10 до 20 мм, 44 штамма (21,3%) — зоны 20–25 мм и 36 штаммов (17,4%) — зоны более 25 мм (табл.1). Наибольшей способностью гидролизовать ксилан среди исследуемых бактерий обладали штаммы самого многочисленного в наших исследованиях вида *B. subtilis*. Из 228 штаммов 161 штамм (70,6%) был способен гидролизовать ксилан. Достаточно активными в использовании этого субстрата были также штаммы видов *B. megaterium* (11 штаммов из 13), *B. pumilus* (6 штаммов из 14), *B. licheniformis* (4 штамма из 25) и *B. cereus* (4 штамма из 24). Виды *B. circulans*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B.adius*, *B. bombycis*, *B. lentus* и *B. pulvifaciens* не способны разлагать ксилан и целлюлозу.

В практике считается важным, чтобы для полного расщепления клеточных оболочек растительного сырья, культуры наряду с ксиланазной обладали высокой целлюлазной активностью. Способных активно гидролизовать как ксилан, так и целлюлозу выявлено 140 штаммов, составивших 39,7% от общего количества исследованных штаммов (табл. 2). Все дальнейшие исследования проводили с этими штаммами. Комплексы ксиланаз и целлюлаз доминировали в основном среди штаммов вида *B. subtilis* (111 из 228, то есть 48,7% от общего количества исследованных штаммов). Широко распространена способность гидролизовать ксилан и целлюлозу среди штаммов вида *B. megaterium* (76,9%). Активные штаммы обнаружены и среди видов *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *Bacillus spp.*, *B. polymyxa*, *B. laterosporus*, *B. oligonitrophilus*, *B. firmus* и *B. macerans*.



Ксиланазная активность бактерий рода *Bacillus*
(диаметр зон гидролиза ксилана)Xylanase activity of genus *Bacillus* bacteria
(the diameter of xylanase hydrolysis zones)

Вид	Количество штаммов	Количество штаммов по диаметру зон гидролиза ксилана, мм				
		0	0,1–10	10–20	20–25	более 25
<i>B. subtilis</i>	228	67	33	68	36	24
<i>B. licheniformis</i>	25	21	0	3	1	0
<i>B. cereus</i>	24	20	2	1	1	0
<i>B. megaterium</i>	13	2	3	3	3	2
<i>B. pumilus</i>	14	8	0	2	1	3
<i>B. coagulans</i>	3	2	0	1	0	0
<i>B. circulans</i>	4	4	0	0	0	0
<i>B. alvei</i>	3	1	0	0	1	1
<i>B. polymyxa</i>	2	1	0	0	0	1
<i>B. brevis</i>	3	2	0	1	0	0
<i>B. thuringiensis</i>	2	2	0	0	0	0
<i>B. firmus</i>	2	1	0	0	0	1
<i>B. laterosporus</i>	2	0	0	1	0	1
<i>B. sphaericus</i>	2	2	0	0	0	0
<i>B.adius</i>	1	1	0	0	0	0
<i>B. bombycis</i>	1	1	0	0	0	0
<i>B. lentus</i>	1	1	0	0	0	0
<i>B. pasteurii</i>	1	0	0	0	0	1
<i>B. macerans</i>	2	1	0	1	0	0
<i>B. pulvifaciens</i>	1	1	0	0	0	0
<i>B. species</i>	15	8	1	5	0	1
<i>B. oligonitrophilus</i>	3	0	0	1	1	1
<i>B. silvestris</i>	1	0	1	0	0	0
Всего	353	-	-	-	-	-
в т.ч. активных	207	-	40	87	44	36
неактивных	146	146	-	-	-	-

Из сообщений различных авторов известно, что ферменты микробного происхождения, могут быть гетерогенными по составу и состоять из различных типов как целлюлаз, так и гемицеллюлаз, различающихся по способу действия, по содержанию углеводов, аминокислот и т.п. [2, 4, 6]. В наших исследованиях гетерогенность ферментных комплексов подтверждается зонами, различающимися не только по диаметру, но и по окраске (желтые, темные и смешанные).

Таблица 2
Способность к гидролизу Na-КМЦ и ксилана у штаммов рода *Bacillus*Table 2
The ability of the strains of genus *Bacillus* to hydrolyze Na-CMC and xylane

Вид	Число штаммов	Na-КМЦ ¹		Ксилан		Na-КМЦ и ксилан	
		к-во	%	к-во	%	к-во	%
<i>B. subtilis</i>	228	160	70,2	161	70,6	111	48,7
<i>B. licheniformis</i>	25	8	32,8	4	16,0	3	12,0
<i>B. cereus</i>	24	6	25,0	4	16,7	2	8,3
<i>B. megaterium</i>	13	10	76,9	11	84,6	10	76,9
<i>B. pumilus</i>	14	10	71,4	6	42,8	3	21,4
<i>B. coagulans</i>	3	1	33,3	1	33,3	-	-
<i>B. circulans</i>	4	-	-	-	-	-	-
<i>B. alvei</i>	3	1	33,3	2	66,7	-	-
<i>B. polymyxa</i>	2	2	100	1	50,0	2	100
<i>B. brevis</i>	3	-	-	1	33,3	-	-
<i>B. thuringiensis</i>	2	1	50,0	-	-	-	-
<i>B. firmus</i>	2	2	100	1	50,0	1	50,0
<i>B. laterosporus</i>	2	2	100	2	100	2	100
<i>B. sphaericus</i>	2	-	-	-	-	-	-
<i>B.adius</i>	1	-	-	-	-	-	-
<i>B. bombycis</i>	1	-	-	-	-	-	-
<i>B. lentus</i>	1	-	-	-	-	-	-
<i>B. pasteurii</i>	1	-	-	1	100	-	-
<i>B. macerans</i>	2	2	100	1	50,0	1	50,0
<i>B. pulvifaciens</i>	1	1	100	-	-	-	-
<i>B. species</i>	15	-	-	7	46,7	3	20,0
<i>B. oligonitrophilus</i>	3	3	100	3	100	2	66,7
<i>B. silvestris</i>	1	-	-	1	100	-	-
Всего	353	209	59,2	207	58,6	140	39,7

Примечание: ¹ — натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы

Следующим этапом для отбора бактерий было проведение исследований по способности отобранных в ходе первичного скрининга штаммов *B. subtilis* использовать 1%-ную суспензию ксилана в качестве единственного источника углерода при их глубинном выращивании на жидкой питательной среде. На примере наиболее активных при расщеплении ксилана штаммов показано, что накопление образующейся ксиланозы в культуральной жидкости у них связано с ростом бактерий в присутствии ксилана на среде, включающей кукурузный экстракт (рис.). На этой



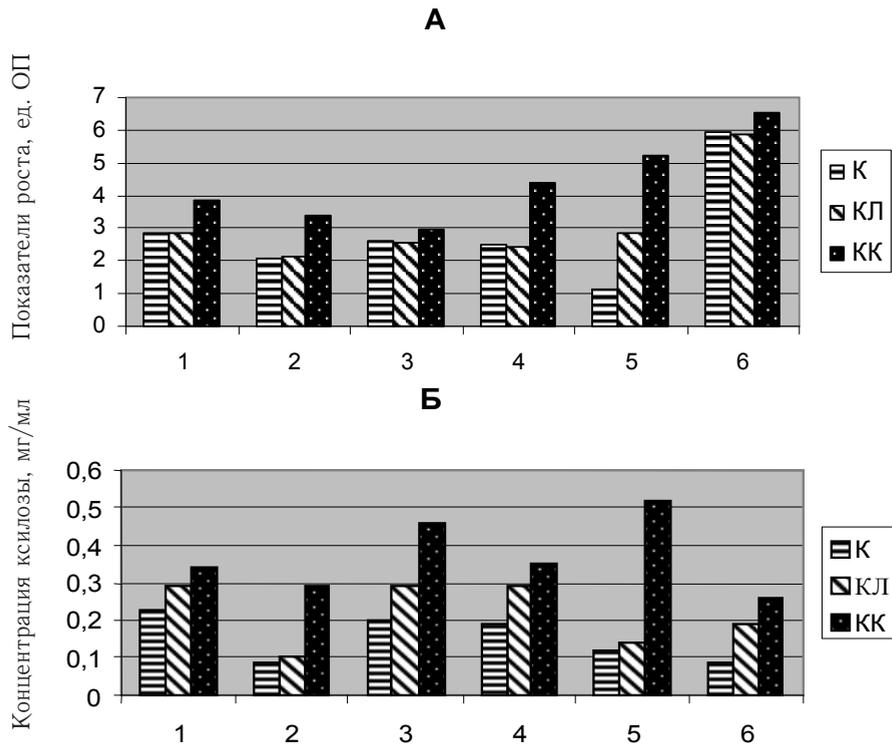


Рис. Показатели роста (А) и ксиланазной (Б) активности на примере штаммов *Bacillus subtilis*
 Штаммы *Bacillus subtilis*: 1 – 518, 2 – 55ЛГ, 3 – 96ЛГ, 4 – МС-19, 5 – 43ЛГ, 6 – 54ЛГ. Среды: К – ксилан (контроль); КЛ – ксилан + лактоза; КК – ксилан+кукурузный экстракт.

Fig. Indices of growth (A) and xylanase (B) activity by example strains *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis strains: 1 – 518, 2 – 55ЛГ, 3 – 96ЛГ, 4 – МС-19, 5 – 43ЛГ, 6 – 54ЛГ. Media: X – xylan; XL – xylan+lactose; XC – xylan+corn extract.

среде наблюдались наиболее существенные различия между штаммами *B. subtilis* как в накоплении биомассы клеток, так и в образовании ими сахаров. О положительном влиянии кукурузного экстракта на образование ксиланаз другими микроорганизмами сообщается и некоторыми исследователями [1]. На средах без кукурузного экстракта или лактозы рост бактерий был более слабым и сопровождался значительно меньшим накоплением в среде редуцирующих сахаров. Полученные результаты дают возможность судить о характере ксиланаз, синтезируемых исследуемыми бактериями в питательной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода ксилан и кукурузный экстракт в качестве индуктора синтеза этих ферментов.

Обобщая полученные результаты скрининга из 353 штаммов бактерий рода *Bacillus*, относящихся к 23 видам, как наиболее активные продуценты ксиланазного комплекса ферментов отобраны 5 штаммов *B. subtilis* (штаммы МС-13₂, 1155, 80 ЛГ), *B. licheniformis* (штамм А_{6/3}) и *B. megaterium* (штамм 906). Данные штаммы

бацилл характеризовались также значительной целлюлозолитической активностью (табл. 3). Поэтому они могут рассматриваться как наиболее перспективные продуценты таких промышленно важных ферментов как целлюлазы и ксиланазы для использования в биотехнологических процессах.

Таблица 3
Ферментативная активность (ед/мл) бактерий рода *Bacillus*

Table 3

Fermentative activity (u/ml) of genus *Bacillus* bacteria

Штамм	Ксиланаза	Эндоглюканаза	β-глюкозидаза
<i>B. subtilis</i> МС-13 ₂	35,7 ± 5,6	158,4 ± 7,5	93,5 ± 2,1
<i>B. subtilis</i> 80 ЛГ	30,6 ± 3,7	292,5 ± 5,9	84,5 ± 1,8
<i>B. subtilis</i> 1155	30,6 ± 3,1	152,5 ± 5,5	85,5 ± 2,0
<i>B. megaterium</i> ИНМИВ 90	30,6 ± 2,5	252,5 ± 3,8	87,5 ± 2,5
<i>B. licheniformis</i> А _{6/3}	34,7 ± 1,9	180,2 ± 2,7	87,5 ± 1,1

Наличие комплекса ферментов, принимающих участие в гидролизе сложно разрушаемых растительных субстратов, очень важно, поскольку ксиланазы делают эти субстраты еще более доступными для действия целлюлозолитических и других ферментов. Действуя на клеточную стенку в комплексе, они могут повысить питательную и биологическую ценность кормов в животноводстве с помощью бактерий рода *Bacillus*, сделать эффективнее такие процессы как консервирование и осахаривание. Такие препараты также могут быть эффективными в других отраслях, таких как пивоварение, производство плодово-ягодных соков и других.

ЛИТЕРАТУРА

1. Головина И.Г. Изучение целлюлитических ферментов термотолерантного штамма *Actinomyces diastaticus* 7 // Прикладная биохимия и микробиология. — 1972. — т.8, №5. — С. 546–553.
2. Михайлова Р.В., Лобанюк А.Г. Гемицеллюлозы и их ферментативное расщепление // Биологически активные вещества микроорганизмов. — Минск: Наука и техника, 1975. — С.3–17.
3. Рухлядева А.П., Полюгалина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. — 288 с.
4. Avcioglu Vanu, Eyyupglu Vanu, Bakir Ufuk. Production and characterization of xylanases of a *Bacillus* strain isolated from soil // World J. Microbiol and Biotechnol. [КЭ] — 2005. — 21, №1. — С. 65–68.
5. Han X.F., Zhend L.S., Xil X.M. Study on screening and cultivation conditions of xylanase - producing alkalophilic bacterial // Wuhan Univ. J. Natur. Sci. — 2004. — 9, №1. — P. 125–128.
6. Heck J.X., Hertz P.E., Ayub M.Z. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid- state cultivation // Braz. J. Microbiol. — 2002. — 33, №3. — P. 213–218.
7. Honda H., Kudo T., Ikura Y., Horikoshi K. Two types of alkalophilic *Bacillus* sp. No C-125 // Can. J. Microbiol. — 1985. — 31. — P. 538–542.
8. Mamadza C., Zvaуа R. Production of cellulases by *Bacillus subtilis* strains cultured on wastewater // Agv. Feod Sci. — 2001. — 23, №1. — P. 15–19.



9. Paul J., Varma A.K. Characterisation of cellulose and hemicellulose degrading *Bacillus* sp. from termite infected soil.// Curr. Sci. — 1993. — 64 (4). — P. 262–266.

10. Subramaniyan S., Prema P. Cellulase - free xylanases from *Bacillus* and other micro-organisms // FEMS Microbiol. Letters. — 2000. — 183. — P. 1–7.

А.І. Осадча, Л.А. Сафронова, Л.В. Авдеєва, В.М. Іляш

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, ГСП, Д 03680, Україна, тел. +38 (044) 526 24 09,
e-mail: safronova_larisa@ukr.net

ЗДАТНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS* ГІДРОЛІЗУВАТИ КСИЛАН

Реферат

Досліджена здатність гідролізувати складноструктурний ксилан у 353 штамів бактерій роду *Bacillus*, що відносяться до 23 видів. Показано, що ця здатність досить поширена серед 207 штамів мікроорганізмів цього роду, що становить 58,6% від усіх досліджених. Серед них домінували штами видів *B. subtilis* (111 штамів із 228) і *B. megaterium* (11 штамів із 13). Здатність гідролізувати ксилан також знайдена у штамів видів *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. species*, *B. oligonitrophilus*. Штами видів *B. circulans*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. badius*, *B. bombycis*, *B. lentus* і *B. pulvifaciens* не гідролізували ксилан. Спостерігались не тільки видові, але і штамові відмінності.

К л ю ч о в і с л о в а: ксиланази, бактерії роду *Bacillus*.

A. I. Osadchaya, L. A. Safronova, L. V. Avdeeva, V.M. Ilyash

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, Zabolotnoho str., 154,
Kiev, D 03680, Ukraine, tel.: +38(044) 526 24 09, e-mail: safronova_larisa@ukr.net

ABILITY OF BACTERIA OF GENUS *BACILLUS* TO HYDROLYZE XYLANE

Summary

The ability to hydrolyze xylane has been investigated in 353 strains of bacteria belonging to 23 species of genus *Bacillus*. Xylanase activity was revealed in 207 strains of the genus (58.6% from all investigated cultures). Strains of species *B. subtilis* (111 strains) and *B. megaterium* (11 strains) dominated among them. Strains of species *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. species*, *B. oligonitrophilus* also displayed activity against xylane. Cultures of species *B. circulans*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. badius*, *B. bombycis*, *B. lentus* and *B. pulvifaciens* did not appear any activity.

К e y w o r d s: xylanases, bacteria of genus *Bacillus*.

