

**Л.В. Авдеева, А.И. Осадчая, М.А. Хархота**

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

## **СВОЙСТВА ЦЕЛЛЮЛАЗ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ РОДА *BACILLUS***

*Изучали энзиматические свойства различных типов целлюлаз, продуцируемых бациллами при глубинном культивировании на среде с тяжелоразрушаемой целлюлозой. Обобщены результаты исследований свойств целлюлаз шести наиболее активных штаммов бацилл. Дан анализ влияния pH и температуры на их активность и стабильность. Установлено, что целлюлазы изучаемых штаммов бацилл проявляют наибольшую активность при pH от 6,0 до 7,0. Исключение составляет  $C_2$ -фермент, имеющий pH-оптимум в более кислой зоне – от 5,0 до 8,0. Температурный оптимум действия  $C_x$ -,  $C_1$ - и  $C_2$ - ферментов – 50 °С, целлюбиазы – 40 °С. Целлюлазы бацилл отличались высокой термостабильностью, которую проявляли в широком интервале температур – от 40 °С до 70 °С.*

*Ключевые слова:* целлюлазы, свойства, *Bacillus*.

Биоконверсия возобновляемого целлюлозосодержащего растительного сырья в различные полезные продукты продолжает оставаться одной из ключевых отраслей биотехнологии. Несмотря на то, что образование целлюлаз вообще, как и биосинтез любых ферментов-белков подчинено генетическому контролю, большинство факторов внешней среды оказывают решающее влияние на характер метаболизма клетки, в первую очередь, действуя на скорость различных ферментативных реакций. К числу основных факторов, определяющих эффективность гидролиза целлюлозосодержащего сырья, относятся прежде всего pH среды и температура. Их действие очень многообразно, они могут влиять на стабильность ферментов, разрушающих их, ускорять или замедлять денатурацию, влиять на сродство их к субстрату [9]. От этих свойств зависят новые возможности и области использования целлюлолитических ферментов [5].

С помощью оптимизации условий культивирования, состава среды и ее pH для исследуемых бактерий нам удалось усилить у бацилл активность ряда гидролитических ферментов. Исследуемые гидролазы проявляли индуцибельный тип секреции, поскольку их продуцирование наблюдалось лишь в присутствии в среде специфических субстратов [1, 2].

Л.В. Авдеева, А.И. Осадчая, М.А. Хархота



В рамках этих исследований актуален и продолжается поиск штаммов микроорганизмов, продуцирующих ферменты с новыми свойствами, среди которых особый интерес представляют кислото- и термостабильные целлюлазы. Недостаточная стабильность ферментов может привести к уменьшению скорости и глубины гидролиза разрушаемых ими субстратов. Перспективную группу организмов для таких исследований составляют бактерии рода *Bacillus*.

Цель настоящей работы заключалась в изучении энзиматических свойств различных типов целлюлаз, продуцируемых бактериями при глубинном культивировании на целлюлозе и обладающих наиболее высокой активностью и стабильностью при различных значениях рН среды и температуры.

### Материалы и методы

В качестве объектов исследования были использованы бесклеточные фильтраты культуральной жидкости шести штаммов *B. subtilis* <sup>23</sup>/<sub>2</sub>, *B. subtilis* 5001, *B. subtilis* 13<sub>2</sub>, *B. subtilis* 39, *B. subtilis* 51 и *B. licheniformis* <sup>6</sup>/<sub>2</sub>, отобранных в результате проведенного скрининга [7].

Культивирование бактерий проводили в жидкой питательной среде при условиях, описанных в работе [7].

Специфичность целлюлаз определяли, измеряя их активность, используя в качестве субстратов для синтеза исследуемых ферментов: натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) — 0,5; целлобиозу — 0,2; целлюлозу — 0,5; хлопковую вату — 0,5 и фильтровальную бумагу — 0,5%. Хлопковую вату переводили в гидроцеллюлозу путем обработки 10н HCl при комнатной температуре в течение 1 суток и тщательного отмывания до нейтрального рН промывными водами [4]. Фильтровальную бумагу тщательно измельчали.

Для определения активности целлюлаз группы C<sub>x</sub> был применен метод определения эндоглюканазной активности по увеличению редуцирующей способности инкубационной смеси с 0,5% Na-КМЦ [11]. C<sub>1</sub>- и C<sub>2</sub>-активность измеряли по количеству растворимых сахаров, образовавшихся из хлопковой ваты и фильтровальной бумаги соответственно. Содержание сахара определяли колориметрическим методом по реакции с 3,5-динитросалициловой кислотой [11]. Целлобиазную активность определяли по возрастанию редуцирующей способности инкубационной смеси, которая состояла из 2,5 мл 0,2% раствора целлобиозы в 1/15 М фосфатном буфере (рН 5,5) и 1 мл фильтрата культуральной жидкости, содержащей фермент.

Для определения рН-оптимума действия C<sub>1</sub>-, C<sub>2</sub>- ферментов и целлобиазы проводили при 40 °С в 1/15 М цитратно-фосфатном буфере, C<sub>x</sub>- фермента — при 50 °С в интервале значения рН от 3,0 до 9,0. Температурный оптимум действия целлюлаз устанавливали при рН 6,0 в интервале температур 30–60 °С.



Термостабільність визначали по залишковій активності ферментів в культуральній рідині після 60-хвилинного прогрівання при 30–90 °С з інтервалом 10 °С і 15–30 хвилин на киплячій водяній бані при 100 °С.

Для вивчення рН-стабільності супернатанти утримували впродовж 1 і 24 годин при 12 °С (щоб уникнути термоінактивності) в діапазоні рН 3,0–9,0 і потім доводили до оптимального для дії відповідних ферментів значення рН і визначали ферментативну активність.

Експерименти проводили в трьох повторностях, в якості критерію достовірності використовували критерій Стюдента на 5% рівні значимості.

### Результати і їх обговорення

Біосинтез целюлаз різними штаммами бацилл найбільш інтенсивно протікає при величині рН середовища від 6,0 до 8,0 [1]. рН-оптимум дії ферментів зазвичай лежить в цих межах значень рН, однак за даними ряду дослідників цей показник може також знаходитися і між значеннями рН 4,5–6,5 і змінюватися в залежності від субстрату і інших умов [6, 10]. Відомі також целюлази з рН-оптимумом при нейтральних і лужних значеннях рН [12].

Отже, для кожного фермента характерен свій рН-оптимум його активності. Іноді він виражений дуже різко, і тоді дія фермента виявляється лише в вузькій зоні значень рН.

Вивчення впливу кислотності середовища на активність целюлаз досліджуваних нами штаммів бацилл виявило схожість оптимумів їх дії:  $C_x$ - і  $C_1$ -ферменти і целлюбіаза мали однакові оптимуми дії в інтервалі рН 6,0–7,0, а  $C_2$ -фермент виявився стійким в більшій кислотній середі і мав оптимум в широкій зоні рН від 5,0 до 8,0 (рис. 1).

В якості прикладу на рис. 1 показано рН-оптимуми  $C_x$ - і  $C_2$ -ферментів у *B. licheniformis* 6/2 і *B. subtilis* 13<sub>2</sub>, відповідно. Відхилення рН в ту чи іншу сторону від оптимума вело до зниження ферментативної активності в 3–5 разів і більше.

Величина рН впливала і на стабільність продуцируваних целюлаз. Результати експериментів показали, що при зсуві рН середовища від оптимального до 8,0 вже після годинного утримання культуральної рідини при 12 °С, у досліджуваних штаммів відзначалося 10–20% зниження  $C_x$ - і  $C_1$ - і 14–33% — целлюбіази. Ще більш значуще зменшення активностей (до 25–30%) викликало збільшення кислотності. При збільшенні утримання культуральної рідини до 24 годин в тих же умовах втрати ферментативної активності були ще більшими — до 40%.

В цілому ж комплекс ферментів представлявся більш стійким в нейтральній і лужній зонах, ніж в кислотній, однак у деяких окремих целюлаз це властивість не завжди спостерігалося.



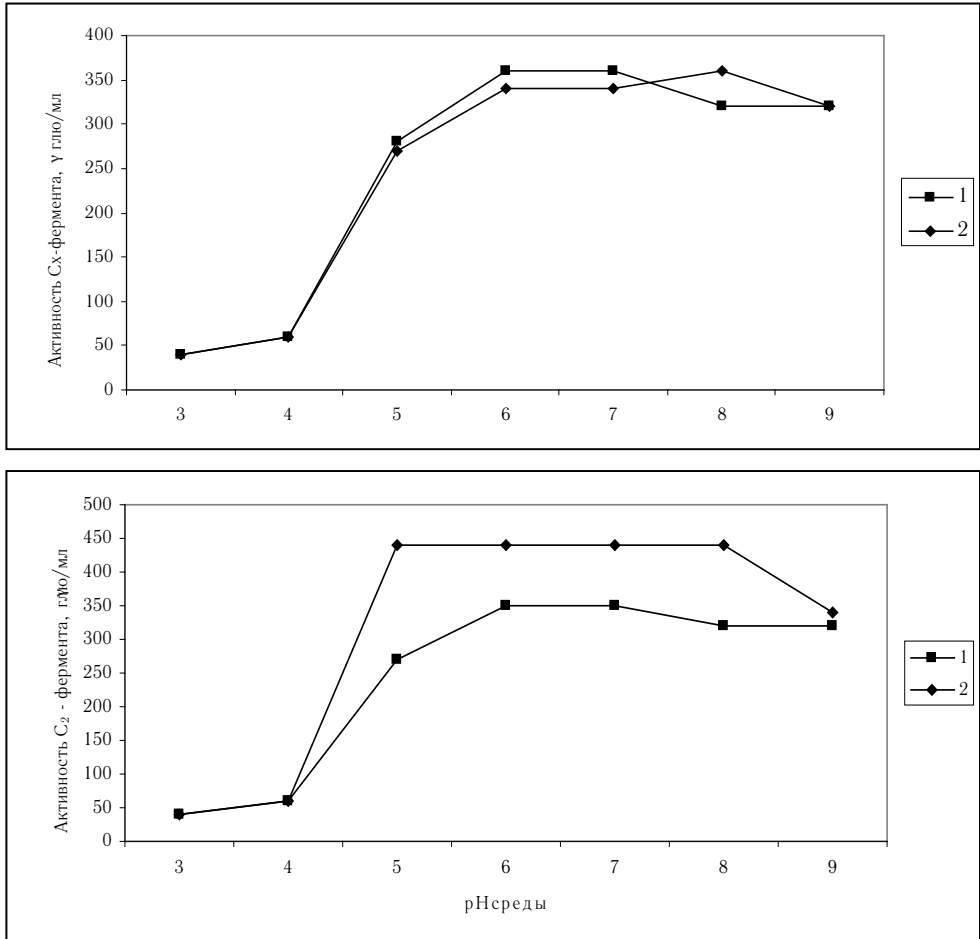


Рис. 1. Зависимость активности  $C_x$ - и  $C_2$ - ферментов от pH реакционной среды на примере штаммов *B. licheniformis* 6/2 (1) и *B. subtilis* 13<sub>2</sub> (2), соответственно

Fig. 1.  $C_x$ - and  $C_2$ - enzymes activity dependence from pH level reactionary medium on the example of strains *B. licheniformis* 6/2 (1) and *B. subtilis* 13<sub>2</sub> (2) pro tanto

Известно, что разные виды целлюлозоразрушающих микроорганизмов способны расти и продуцировать целлюлазы лишь в определенных температурных пределах, выше которых активность ферментов снижается. Оптимум действия ферментов обычно находится в пределах 40–60 °С [9]. Однако имеются сообщения об оптимуме действия при более высокой температуре – 90 °С [6].

Исследуемые штаммы бацилл обладают способностью синтезировать целлюлазы в пределах температуры от 30 до 60 °С. Наиболее активной при 40 °С выявилась целлобиаза, в то время как  $C_x$ -,  $C_1$ - и  $C_2$ -ферменты были наиболее активны при температуре, равной 50 °С (рис. 2). Эти значения температур были использованы нами в качестве контрольных при исследовании термостабильности у исследуемых ба-

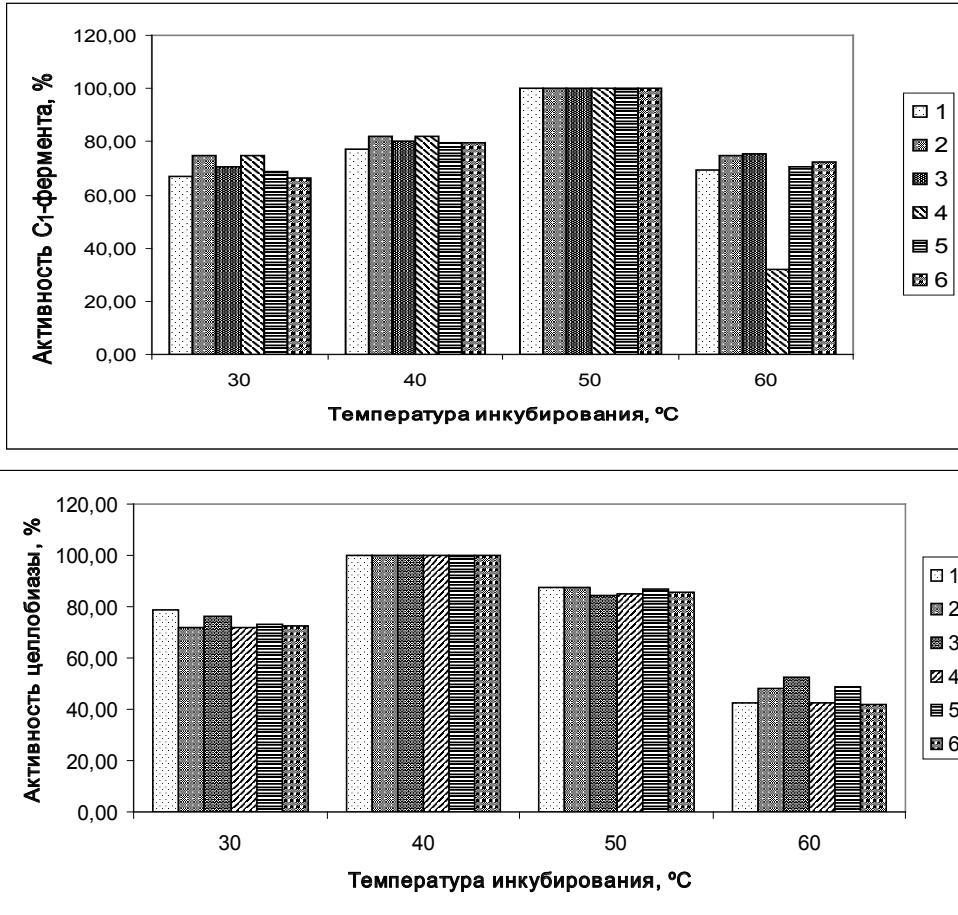


Рис. 2. Зависимость целлюлазной активности и активности C<sub>1</sub>- фермента целлюлазного комплекса у бактерий рода *Bacillus* от температуры (при pH-оптимуме 6,0)

1–6 — штаммы *B. subtilis* 39, 51, 23/2, 5001, 13<sub>2</sub> и *B. licheniformis* 6/2, соответственно.

Fig. 2. Cellobiases activity dependence and activity of cellulases complex C<sub>1</sub>-enzymes of bacteria of genus *Bacillus* from temperature (at pH-optimum 6,0)

1–6 — strains *B. subtilis* 39, 51 23/2, 5001, 13<sub>2</sub> and *B. licheniformis* 6/2 pro tanto.

цилл, а активности соответствующих ферментов при этих температурах были приняты за 100%.

Исходя из имеющихся источников, в которых показано, что внеклеточные гидролазы бацилл вообще характеризуются высокой термостабильностью [8], можно было бы ожидать, что гидролазы с целлюлолитическим действием также будут устойчивыми к повышенной температуре.

В узком интервале температур 40–50 °C у всех исследуемых штаммов проявлялась наибольшая термостабильность активности только для C<sub>x</sub>-

фермента. Активность других типов целлюлаз была наиболее стабильной в более широком интервале — от 40 до 70 °С ( рис. 3).

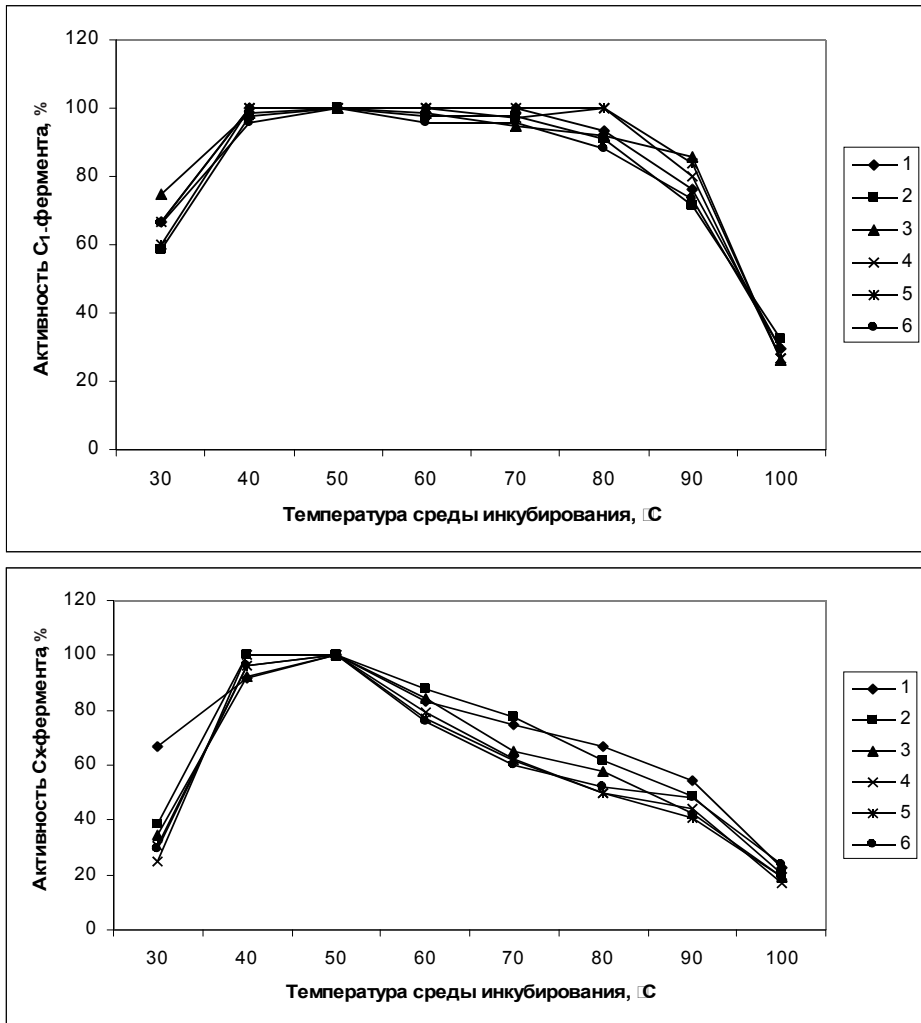


Рис. 3. Термостабильность активности C<sub>x</sub>- и C<sub>1</sub>-ферментов целлюлозного комплекса бактерий рода *Bacillus* в зависимости от температуры (при pH-оптимуме 6,0)

Обозначения те же, что к рис. 2.

Fig. 3. Dependence of activity thermostability of cellulolytic complex C<sub>x</sub>- and C<sub>1</sub>-enzymes of bacteria of genus *Bacillus* upon temperature (at pH-optimum 6,0)

The same notations that to fig. 2.

И несмотря на то, что с повышением температуры обычно наблюдается не только ускорение процесса гидролиза, но и повышается скорость инактивации ферментов, в проводимых опытах после прогревания культуральной жидкости в течение 1 часа даже при температуре 80 °С

происходила только частичная инактивация ферментов изучаемого комплекса, при этом сохранялось еще до 50,0–66,1% активности  $C_x$ -фермента, до 90–99% целлюбиазы, до 87,5–99,0%  $C_1$ -фермента и до 78–88% активности  $C_2$ -фермента. Заслуживает внимания и то, что даже после получасового кипячения культуральной жидкости при 100 °С на водяной бане сохранялось еще до 14–25% активности  $C_x$ - и  $C_2$ -ферментов и до 26–32% —  $C_1$ -фермента. Наиболее термостабильной оказалась целлюбиазная активность: ее в этих условиях сохранялось даже до 73,7–84,8% от исходной. В литературе также известны ферменты, которые при кратковременном нагреве до 100 °С в течение 10–15 мин не теряли своей активности [3, 7].

Высокая термостабильность целлюлолитических ферментов микроорганизмов считается уникальной и ее объясняют в первую очередь строением и подвижностью белковой молекулы. Эта способность микроорганизмов открывает новые перспективы биотехнологического применения целлюлаз.

Потребность в термо- и рН-стабильных ферментах в различных производствах высокая. Их использование позволит снизить стоимость ферментативного процесса за счет сокращения времени гидролиза растительных материалов и значительного уменьшения микробного инфицирования используемых субстратов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеева Л.В., Осадча А.І., Сафронова Л.А., Іляш В.М., Хархота М.А. Вплив рН поживного середовища на біосинтез гідролітичних ферментів у бацил // Мікробіологічний журнал. — 2010. — 72, № 5. — С. 3–7.
2. Авдеева Л.В., Осадча А.І., Сафронова Л.А., Іляш В.М., Хархота М.А. Синтез гідролітичних ферментів у бацилл в залежності від складу поживного середовища // Мікробіологія і біотехнологія. — 2010. — № 1. — С. 44–52.
3. Безбородов А.М. Ферментативные процессы в биотехнологии. — М.: Наука, 2008. — 335 с.
4. Клесов А.А., Черноглазов В.М., Рабинович М.А., Синицын А.П. Роль адсорбционной способности эндоглюканазы в деградации кристаллической и аморфной целлюлозы // Биоорган. химия. — 1982. — Т. 8, № 5. — С. 643–651.
5. Маслова Н.Ф., Краморенко Е.А. Эффективность и актуальность создания новых ферментных препаратов на основе микробиологических субстанций для нормализации пищеварения // Фармаком. — 2008. — № 4. — С. 39–45.
6. Морозкина Е.В., Слуцкая Э.С., Федорова Т.В., Тугай Т.И., Голубева Л.И., Королева О.В. Экстремальные микроорганизмы: биохимичес-



кая адаптация и биотехнологическое применение (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. — 2010. — 46, № 1. — С. 5–20.

7. Осадчая А.И., Сафронова Л.А., Авдеева Л.В., Иляш В.М. Скрининг штаммов с высокой целлюлазной активностью // Микробиологический журнал. — 2009. — Т. 71, № 5. — С. 41–48.

8. Павлова И.Н., Ротанова Т.В., Жолнер Я.Г. Аминопептидаза термофильного штамма *Bacillus licheniformis* // Микробиологический журнал. — 1989. — Т. 51, № 2. — С. 47–52.

9. Рабинович М.А., Черноглазов В.М., Клесов А.А. Классификация целлюлаз, их распространение, множественные формы и механизм действия. М.: ВИНТИ, 1988. — 11. — С. 4–189.

10. Рид Дж. Ферменты в пищевой промышленности. М.: Пищевая промышленность, 1971. — 44 с.

11. Рухлядева А.П., Польшалина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. — 288 с.

12. Соловьева И.В., Окунев О.Н., Крюкова Е.Г., Попова Н.Н., Синицын А.П., Черноглазов В.М. Нейтральные целлюлазы мицелиальных грибов: поиск продуцентов и изучение некоторых свойств // Прикладная биохимия и микробиология. — 1997. — Т. 33, № 4. — С. 388–392.

UDC 577.152.3

**L.V. Avdeeva, A.I. Osadcha, M.A. Kharkhota**

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, akad. Zabolotny Str., Kyiv, D 03680, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: avdeeva@imv.kiev.ua

## **PROPERTIES OF THE CELLULASES PRODUCED BY BACTERIA OF GENUS *BACILLUS***

### **Summary**

It was studied the enzymatic properties of various types of the cellulases produced by bacilli at cultivation on medium with cellulose. The results of cellulases properties researches of six the most activ bacilli strains are generalised. The analysis of pH influence and temperature on their activity and stability is given. It is determined that studied strains cellulases of bacilli display the most activity at pH from 6.0 to 7.0. The exception compound is  $C_2$ -enzyme, having pH — optimum in more acid region — from 5.0 to 8.0. The temperature action optimum of  $C_x$  —  $C_1$ - and  $C_2$  — enzymes is 50 °C, cellobioses — 40 °C.

Bacilli cellulases differed in high thermostability which displayed in a wide interval of temperatures — from 40 °C to 70 °C.

**Key words:** the properties, cellulases, bacteria of genus *Bacillus*.





УДК 577.152.3

**Л.В. Авдеєва, А.І. Осадча, М.А. Хархота**

Інститут мікробіології і вірусології НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д 03680, Україна,  
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: avdeeva@imv.kiev.ua

## **ВЛАСТИВОСТІ ЦЕЛЮЛАЗ, ПРОДУКОВАНИХ БАКТЕРІЯМИ РОДА *BACILLUS***

### **Реферат**

Вивчено ензиматичні властивості різних типів целюлаз, що продукуються бацилами при глибинному культивуванні на середовищі з целюлозою. Узагальнено результати досліджень властивостей целюлаз шести найбільш активних штамів бацил. Дано аналіз впливу рН і температури на їх активність та стабільність. Встановлено, що целюлази досліджених штамів бацил проявляють найбільшу активність при рН від 6,0 до 7,0. Виключення складає  $C_2$ -фермент, що має рН-оптимум в більш кислій зоні — від 5,0 до 8,0. Температурний оптимум дії  $C_x$ -,  $C_1$ - і  $C_2$ - ферментів — 50 °С, целобіаза — 40 °С.

Целюлази бацил відрізнялися високою термостабільністю, яка проявлялася в широкому інтервалі температур — від 40 °С до 70 °С.

**Ключові слова:** целюлази, властивості, *Bacillus*.

