

**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

## **ЦЕЛЛЮЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS***

*Изучена способность к синтезу и продуцированию целлюлаз бактериями рода *Bacillus* при культивировании на целлюлозе в глубинных условиях. Показано, что ферментативный гидролиз целлюлозы бациллами осуществляется под действием целлюлазного комплекса, состоящего из целлюлаз разного типа:  $C_x$ -фермента, расщепляющего карбоксиметилцеллюлозу,  $C_1$ -фермента, расщепляющего хлопковую вату,  $C_2$ -фермента, расщепляющего фильтровальную бумагу и целлобиазы. Прослежена динамика биосинтеза различных компонентов целлюлазного комплекса у изучаемых бактерий. Показано, что максимум выхода продуктов гидролиза можно получить на третьи сутки их культивирования на целлюлозе.*

*Ключевые слова:* бактерии рода *Bacillus*, целлюлазный комплекс.

Микробная конверсия целлюлозы продолжает оставаться важнейшим направлением исследований в биотехнологии. Расщепление широко распространенных, ежегодно возобновляемых растительных отходов является важным и актуальным.

Большой интерес представляет специфичность гидролитических ферментов, способных расщеплять различные целлюлозосодержащие растительные отходы и делать их пригодными для использования в пищевых целях.

Согласно имеющимся представлениям по схеме Рииза, процесс ферментативного гидролиза целлюлозы у микроорганизмов может происходить под действием комплекса целлюлаз, состоящего из  $C_1$ -,  $C_x$ - ферментов и  $\beta$ -глюкозидазы [8, 12]. Кроме  $C_1$ - и  $C_x$ - ферментов исследователями выделен также  $C_2$ -фермент, который очень близок к  $C_1$ -ферменту. Под действием  $C_1$ -фермента целлюлоза начинает набухать, а затем подвергаться воздействию  $C_2$ -фермента до образования целлодекстринов, которые уже под действием  $C_x$ -фермента расщепляются до целлобиозы [11].

Ключевым свойством, характеризующим целлюлазный комплекс микроорганизмов, с помощью которого осуществляется конверсия, является способность к глубокому осаживанию и деструкции целлю-



лозосодержащих субстратов, другими словами, его сахаролитическая активность [1, 11]. Поэтому исследования ученых и специалистов были направлены, в основном, на поиск ферментных препаратов и их продуцентов, эффективно осуществляющих гидролиз целлюлозы до глюкозы, которые успешно найдены уже среди грибов и многих видов бактерий. Однако, лишь небольшое количество из них способны синтезировать внеклеточные целлюлазы и гидролизовать высокоструктурную кристаллическую целлюлозу. Среди них заслуживают внимания бактерии рода *Bacillus* [2, 7, 13].

Ранее нами был осуществлен скрининг продуцентов целлюлаз среди бактерий рода *Bacillus* и отобраны штаммы с высокой целлюлазной активностью [6].

Цель настоящей работы заключалась в изучении способности к синтезу и продуцированию целлюлазных комплексов бактерий рода *Bacillus* и определение их состава при глубинном культивировании на различных целлюлозосодержащих субстратах.

### Материалы и методы

В качестве объектов исследования были использованы 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 скрининга [6]. В каждом случае для определения активности исследуемых ферментов использовали 1 мл фильтрата культуральной жидкости. Культивирование бактерий проводили в жидкой питательной среде при условиях, описанных в работе [6].

Активность целлюлаз определяли, измеряя их активность при использовании в этой среде в качестве единственного источника углерода для синтеза исследуемых ферментов (%): Na-КМЦ (натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы) — 0,5; целлобиозу — 0,2; целлюлозу — 0,5; хлопковую вату — 0,5 и фильтровальную бумагу — 0,5. Хлопковую вату переводили в гидроцеллюлозу путем обработки 10 н HCl при комнатной температуре в течение одних суток и тщательного отмывания до нейтрального pH промывных вод [5]. Фильтровальную бумагу тщательно измельчали и размалывали на кофемолке.

Для определения активности целлюлаз группы C<sub>x</sub> был применен метод определения эндоглюканазной активности по увеличению редуцирующей способности реакционной смеси с 0,5%-ной Na-КМЦ [7]. Активность C<sub>1</sub>- и C<sub>2</sub>-ферментов измеряли по количеству редуцирующих сахаров, образовавшихся из хлопковой ваты и фильтровальной бумаги, соответственно. Содержание сахара определяли колориметрическим методом по реакции с 3,5-динитросалициловой кислотой [9]. Целлобиазную активность определяли по возрастанию редуцирующей способности реакционной смеси с 0,2%-ным раствором целлобиозы в 1/15 М фосфатном буфере (pH 5,5).



Статистическую обработку трех экспериментальных серий исследований проводили с помощью стандартных методов с определением t-критерия Стьюдента на 5% уровне значимости.

### Результаты и их обсуждение

Эффективность гидролиза высокоструктурной и тяжелоразрушаемой целлюлозы микроорганизмами зависит от сбалансированности состава продуцируемого ими целлюлазного комплекса, а также от уровня активности его компонентов, то есть от качественного и количественного его состава. Это основные требования, без которых невозможен глубокий гидролиз целлюлозы [3, 7, 8, 10].

Результаты проведенных экспериментальных исследований показали, что внеклеточные бактериальные целлюлазы изучаемых штаммов бацилл проявляли активность не только по отношению к растворимым производным целлюлозы типа КМЦ, но и гидролизовали нерастворимую (хлопковую вату, фильтровальную бумагу), а также кристаллическую целлюлозу.

Активность ферментов целлюлазного комплекса, продуцируемого бактериями рода *Bacillus* на различных целлюлозосодержащих субстратах, представлена в табл. 1. По качественному компонентному составу целлюлазные комплексы разных штаммов бактерий практически не различались.

Таблица 1  
Активность ферментов целлюлазного комплекса бактерий рода *Bacillus* на различных субстратах

Table 1  
Activity of enzymes of cellulases complex produced by bacteria of genus *Bacillus* on various substrat

Штамм	Целлюлазная активность редуцирующих сахаров (мг редуцирующих сахаров на мл реакционной смеси)			
	На - КМЦ	Целлобиоза	Хлопковая вата	Фильтровальная бумага
<i>B. subtilis</i> 39	0,48±0,02	0,60±0,01	0,40±0,02	0,35±0,01
<i>B. subtilis</i> 51	0,44±0,03	0,52±0,02	0,34±0,03	0,35±0,02
<i>B. subtilis</i> 23/2	0,44±0,02	1,16±0,01	0,42±0,02	0,42±0,01
<i>B. subtilis</i> 5001	0,42±0,03	0,94±0,02	0,44±0,02	0,50±0,02
<i>B. subtilis</i> 132	0,46±0,01	1,16±0,01	0,39±0,03	0,48±0,03
<i>B. licheniformis</i> 6/2	0,46±0,01	0,82±0,03	0,36±0,04	0,42±0,04



Исследуемые штаммы гидролизovali КМЦ, хлопковую вату, фильтровальную бумагу с высвобождением в среду глюкозы от  $0,34 \pm 0,03$  до  $0,50 \pm 0,02$  мг/мл. Однако секретирuемыми на целлюлозе ферментами наиболее интенсивно расщеплялась целлобиоза с высвобождением наибольшего количества глюкозы — от  $0,52 \pm 0,02$  до  $1,16 \pm 0,01$  мг/мл. Наибольшей активностью среди всех исследуемых отличались штаммы *B. subtilis* 23/2, 5001, 132.

По результатам исследований способности синтеза и выделения в среду целлюлолитических ферментов, можно заключить, что целлюлазный комплекс каждого из изучаемых штаммов бактерий рода *Bacillus* представляет собой сложную систему с разным соотношением активностей отдельных компонентов, способных расщеплять глюкопиранозные цепи различных целлюлозных субстратов. Гидролиз целлюлозосодержащих субстратов осуществляется комплексом продуцируемых бациллами целлюлолитических ферментов и можно констатировать, что в их состав в соответствии с классификацией Рииза [12] входят: эндоглюканаза ( $C_x$ -фермент, расщепляющий КМЦ),  $C_1$ -фермент (расщепляющий хлопковую вату),  $C_2$ -фермент (расщепляющий фильтровальную бумагу) и целлобиаза, расщепляющая целлобиозу. Эндоглюканаза первой расщепляет связи, удаленные от концов полимерной цепи молекулы, и приводит к существенному уменьшению степени полимеризации целлюлозы и увеличению скорости ее гидролиза. Целлобиаза отщепляет от уже частично гидролизованной эндоглюканазой целлюлозы целлобиозу и образует глюкозу [2, 3, 7]. На рисунке приведена динамика биосинтеза ферментов целлюлазного комплекса штаммом *B. subtilis* 23/2.

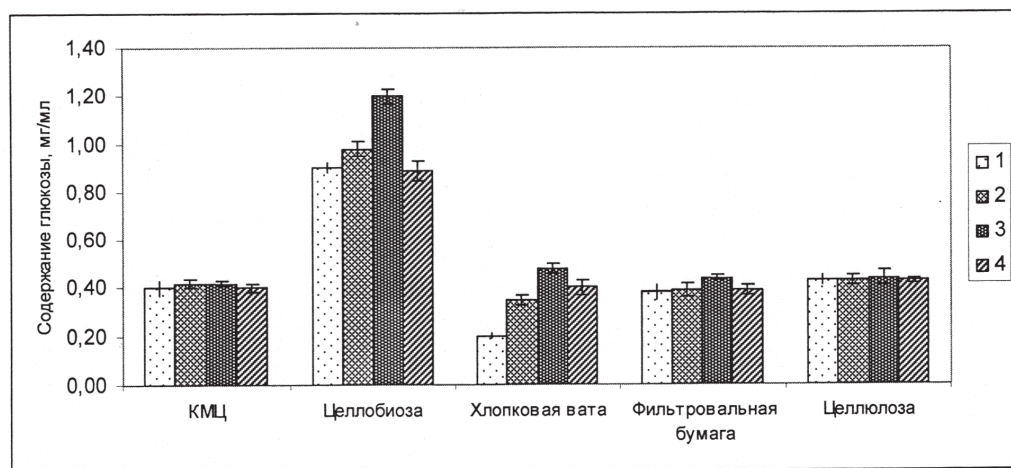


Рис. Динамика биосинтеза целлюлазного комплекса штаммом *B. subtilis* 23/2 в условиях глубинного культивирования на разных субстратах  
Обозначения: время культивирования бактерий: 1—24, 2—48, 3—72 и 4—96 час.

Fig. Dynamics of biosynthesis of cellulolytic complex by *B. subtilis* 23/2 strain at deep cultivation on different substrata  
Designations: time of cultivation of bacteria: 1—24, 2—48, 3—72 and 4—96 hours.

Для остальных штаммов бацилл получены аналогичные данные. С рисунка видно, что максимум выхода продуктов гидролиза (глюкозы) изучаемыми штаммами наблюдался в основном через трое суток на средах с различными целлюлозосодержащими субстратами (КМЦ, хлопковую вату, фильтровальную бумагу), используемыми в качестве единственного источника углерода и индуктора биосинтеза исследуемых ферментов.

Результаты проведенных исследований также показали, что в количественном отношении ферментный состав продуцируемого бациллами целлюлазного комплекса при культивировании на самом труднорасщепляемом субстрате — целлюлозе, варьирует в широких пределах в зависимости от вида и даже штамма (табл. 2). Соотношение отдельных целюлаз в продуцируемом комплексе у исследуемых штаммов бацилл различно. Так, если у штамма *B. subtilis* 5001 разные типы целлюлаз образуются примерно в равном соотношении, то у *B. subtilis* 39 и *B. licheniformis* <sup>6</sup>/<sub>2</sub> продуцируется более всего C<sub>2</sub>-фермента, у штамма *B. subtilis* 13<sub>2</sub> — C<sub>1</sub>-фермента, у *B. subtilis* 51 — C<sub>x</sub>-, C<sub>2</sub>-ферментов. Для штамма *B. subtilis* <sup>23</sup>/<sub>2</sub> характерно соотношение с наибольшими по величине активностями C<sub>1</sub>- и C<sub>x</sub>-ферментов и целлобиазы. Вероятно, при совместном применении немаловажное значение имеют не только высокие активности отдельных ферментов, но и их соотношение.

Таблица 2

Соотношение отдельных целлюлаз в ферментативном комплексе бактерий рода *Bacillus*

Table 2

Interrelation of cellulases in enzymatic complex of bacteria of genus *Bacillus*

Штамм	Редуцирующие сахара (мг/мл)				C <sub>x</sub> : C <sub>2</sub> : C <sub>1</sub> : C <sub>2</sub>
	C <sub>x</sub> -фермент	Целлобиаза	C <sub>1</sub> -фермент	C <sub>2</sub> -фермент	
<i>B. subtilis</i> 39	0,370±0,015	0,370±0,016	0,400±0,012	0,480±0,012	1 : 1 : 1,1 : 1,3
<i>B. subtilis</i> 51	0,400±0,007	0,300±0,014	0,300±0,015	0,380±0,013	1,3 : 1 : 1 : 1,3
<i>B. subtilis</i> <sup>23</sup> / <sub>2</sub>	0,370±0,016	0,380±0,015	0,380±0,014	0,320±0,010	1,2 : 1,2 : 1,3 : 1
<i>B. subtilis</i> 5001	0,490±0,014	0,490±0,014	0,490±0,015	0,490±0,012	1 : 1 : 1 : 1
<i>B. subtilis</i> 13 <sub>2</sub>	0,420±0,014	0,400±0,011	0,660±0,012	0,440±0,013	1 : 1 : 1,6 : 1
<i>B. licheniformis</i> <sup>6</sup> / <sub>2</sub>	0,490±0,016	0,490±0,012	0,490±0,012	0,620±0,014	1 : 1 : 1 : 1,3

Примечание: за единицу принято наименьшее по абсолютному значению содержание глюкозы, образовавшейся при разложении целлюлозы ферментами каждого штамма отдельно.

The note: for unit is accepted as the least on absolute value the maintenance of the glucose formed at decomposition of cellulose each strain separately.



По имеющимся данным, от соотношения активностей ферментов в целлюлазном комплексе, от их взаимодействия, то есть от наличия так называемого эффекта синергизма зависит эффективность и глубина гидролиза субстратов [2, 7, 10]. Этой теме будут посвящены отдельные исследования.

Таким образом, проведенными исследованиями показано, что изучаемые штаммы бацилл обладают важнейшим свойством — широкой субстратной специфичностью образуемых ими целлюлазных комплексов, состоящих из нескольких целлюлаз разного типа, то есть способностью активно расщеплять как различные производные целлюлозы, так и нативную кристаллическую целлюлозу. Результаты данных исследований компонентного состава и активности целлюлазного комплекса бацилл будут способствовать существенному увеличению эффективности и глубине гидролиза ими целлюлозосодержащих материалов, в частности, высокоструктурной наиболее недоступной для использования части растительных отходов сельского хозяйства.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Анкудимова Н.В., Баразненко В.А., Беккер Е.Г., Окунев О.Н. Целлюлазный комплекс *Chaetomium cellulolyticum*: выделение и свойства основных компонентов // Биохимия. — 1999. — Т. 64, в. 9. — С. 1267—1273.
2. Борзова Н.В., Варбанець Л.Д. Целюлозодеградуючі системи мікроорганізмів: біосинтез, властивості та структурно- функціональні особливості // Біотехнологія. — 2009. — Т. 2, № 2, — С. 23—41.
3. Клесов А.А. Ферменты целлюлазного комплекса // Проблемы биоконверсии растительного сырья. — М., Наука, 1986, — С. 93—51.
4. Клесов А.А., Черноглазов В.М., Рабинович М.А., Сеницын А.П. Роль адсорбционной способности эндоглюканазы в деградации кристаллической и аморфной целлюлозы // Биоорганич. химия. — 1982. — Т. 8, № 5. — С. 643—651.
5. Маслова Н.Ф., Крамаренко Е.А. Эффективность применения и актуальность создания новых ферментных препаратов на основе микробиологических субстанций для нормализации пищеварения // Фармакология. — 2008. — № 4. — С. 39—5.
6. Осадчая А.И., Сафронова Л.А., Авдеева Л.В., Иляш В.М. Скрининг штаммов с высокой целлюлазной активностью // Микробиологичный журнал. — 2009. — Т. 71, № 5. — С. 41—48.
7. Рабинович М.Л., Мельник М.С., Болобова А.В. Целлюлазы микроорганизмов (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. — 2002. — Т. 38, № 4. — С. 355—373.
8. Рабинович М.Л., Черноглазов В.М., Клесов А.А. Классификация целлюлаз, их распространенность, множественные формы и механизм действия целлюлаз // В сб. Итоги науки и техники ВИНТИ Биотехнология.— 1988. — Т. 11. — С. 1—224.



9. Рухлядева А.П., Польшгаліна Г.В. Методи визначення активності гідролітичних ферментів. — М.: Легк. і пищ. пром-сть, 1981. — 288 с.

10. Сіницін А.П., Митькевич О.В., Калюжний С.В., Клесов А.А. Изучение синергизма в действии ферментов целлюлазного комплекса // Биотехнология. — 1987. — №. 1. — С. 39—46.

11. Фениксова Р.В. Ферментативное расщепление целлюлозы.— М.; Изд-во «Наука», 1967. — 160 с.

12. Reise E.T., Sin R.Y.H, Levinson H.S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relation to the mechanism of cellulose hydrolysis // J. Bacteriol. — 1950. — 59 . — P. 485—488.

13. Wood T.M. Properties of cellulosic enzyme systems // Biochem. Soc. Trans. — 1985. — V. 13, № 2 . — P. 407—410.

**Л.В. Авдеева, 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

## ЦЕЛЮЛАЗНА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS*

### Реферат

Вивчена здатність до синтезу і продукування целюлаз бактеріями роду *Bacillus* при культивуванні на целюлозі в глибинних умовах. Показано, що ферментативний гідроліз целюлози бацилами здійснюється під дією целюлазного комплексу, що складається з декількох целюлаз різного типу:  $C_x$ -фермента, що розщеплює карбоксиметилцелюлозу,  $C_1$ -фермента, що розщеплює бавовняну вату,  $C_2$ -фермента, що розщеплює фільтрувальний папір, і целобіази. Вивчено динаміку біосинтезу різних компонентів целюлазного комплексу у досліджуваних бактерій. Показано, що максимум виходу продуктів гідролізу можна отримати на третю добу культивування на целюлозі.

Ключові слова: бактерії роду *Bacillus*, целюлазний комплекс.



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

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

## CELLOLYTIC ACTIVITY OF BACTERIA OF GENUS *BACILLUS*

### Summary

There has been studied cellolytic complex of bacteria of genus *Bacillus*, produced by them at cultivation on cellulose in deep conditions. There have been shown that enzymatic hydrolysis of cellulose is carried out under the action cellulytic complexes consisting of several cellulases of different types: C<sub>x</sub>-enzyme splitting CMC, C<sub>1</sub>-enzym, splitting cotton wool, C<sub>2</sub>-enzym, splitting the filtering paper, and cellobioses, capable of hydrolyzing cellobiosas. There has been followed the dynamics of biosynthesis by studied bacteria of cellolytic complex components. There has been shown that the maximum of field of hydrolysis products can be received on the third day of deep cultivation.

Key words: bacteria of genus *Bacillus*, cellolytic complex.

