

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

БИОСИНТЕЗ ЦЕЛЛЮЛАЗ ПРОБИОТИЧЕСКИМИ ШТАММАМИ *BACILLUS SUBTILIS* ПРИ СОВМЕСТНОМ ВЫРАЩИВАНИИ

*Изучены рост пробиотических штаммов *B. subtilis* 5139 и *B. subtilis* 5140 и биосинтез выделяемых ими в среду ферментов целлюлазного комплекса при глубинном способе культивирования на целлюлозе. Показана возможность использования совместного культивирования изучаемых штаммов не только для интенсификации накопления ими биомассы клеток, но и биосинтеза внеклеточных целлюлаз, в том числе при добавлении в среду культивирования лактата или лактулозы в качестве дополнительного источника углерода.*

*Ключевые слова: *Bacillus*, целлюлазы, совместное культивирование.*

Для создания комплексных пробиотиков, в том числе и синбиотиков, большое значение приобретают смешанные культуры бактерий, что приводит к более полному усвоению источников питания, а также упрощению технологии производства целевого продукта. Уже разработаны технологии совместного глубинного культивирования при создании ряда биопрепаратов на основе штаммов кишечной палочки и энтерококка, бифидо-, лактобактерий и бацилл [3, 5, 7, 12–15]. Применение совместного культивирования — идея не новая. Его издавна использовали для биосинтеза белков, биологически активных веществ, очистки сточных вод, оптимизации и интенсификации процессов выращивания и получения микробных клеток [11–12].

Смешанные культуры используют также для интенсификации процесса биосинтеза ферментов микроорганизмами различных таксономических групп с целью увеличения активности экзопротеаз и литических ферментов [2, 6–9, 14–15]. Это дает возможность, с одной стороны, ускорить биосинтез того или иного фермента и увеличить его активность, с другой — усилить или пополнить комплекс ферментов с целью более глубокого гидролиза субстрата, а также значительно расширить спектр потребляемых субстратов. Примеров применения этого способа культивирования для усиления биосинтеза целлюлолитических ферментов нами не найдено.



Изучаемые нами штаммы бактерий *B. subtilis* 5139 и *B. subtilis* 5140, на основе которых методом отдельного глубокого культивирования уже создан высокоэффективный пробиотик эндоспорин для лечения и профилактики ряда послеродовых и кишечных заболеваний, характеризуются высокой биохимической лабильностью, способностью синтезировать многие соединения (антибиотики, ферменты, экзополисахариды) [3, 4].

Настоящая работа посвящена изучению особенностей биосинтеза целлюлолитических ферментов пробиотическими штаммами *B. subtilis* 5139 и *B. subtilis* 5140 при совместном их выращивании на целлюлозе.

Материалы и методы

Объектом исследований служили пробиотические штаммы *B. subtilis* 5139 и *B. subtilis* 5140, являющиеся основой препарата эндоспорин [4].

Совместное и отдельное культивирование бактерий проводили в течение 24 часов на оптимизированной для их роста среде следующего состава (г/л): натрия цитрат — 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, pH среды — $7,0 \pm 0,2$, с добавлением 0,5% кукурузного экстракта. В качестве основного источника углерода использовали целлюлозу (0,5%), а в качестве дополнительного источника углеродного питания лактит или лактулозу (по 15%). Лактит и лактулоза — продукты изомеризации лактозы, химически близкородственные соединения с известными пребиотическими свойствами, используются в составе пищевых продуктов и при создании комплексных препаратов [11]. В состав лактулозы входит галактоза и фруктоза, лактита — галактоза и сорбит [10].

В качестве посевного материала использовали суточные культуры исследуемых штаммов бактерий, выращенных на среде аналогичного состава с добавлением глюкозы (1,5%) при температуре 37 ± 2 °C на качалке при 200 об/мин. Посевной материал состоял из смеси выросших суспензий штаммов в соотношении 1:1. Перед смешиванием культур оптические плотности их суспензий уравнивали физраствором к 0,5 ед. на ФЕК 56 при длине волны 540 нм. Полученную таким образом суспензию культур вносили в среду из расчета 5 об%, что соответствовало количеству клеток 10^6 – 10^7 в 1 мл.

Активности целлюлолитических ферментов в надосадочной жидкости определяли по количеству глюкозы в 1 мл культуральной жидкости в соответствии с методами, ранее описанными в работе [1]. Исследование стабильности целлюлаз в зависимости от pH среды проводили в растворах 1/15 М цитратно-фосфатного буфера с величиной pH 5,5 при 50 °C. pH-стабильность ферментов изучали после инкубации культуральной жидкости в течение 1 часа и 24 часов при температуре 12 °C (во избежание термоинактивации). Термостабильность целлюлаз исследовали после прогревания культуральной жидкости в течение часа при температурах от 30 °C до 100 °C (с интервалом 10 °C) в 1/15 М цитратно-фосфатном буфере (pH 6,0) и инкубирования в течение 1 часа при 50 °C. Опреде-



ление температурного оптимума действия ферментов проводили при температурах от 30 °С до 70 °С в том же буфере при рН 6,0.

Эксперименты проводили в трех повторностях, в качестве критерия достоверности использовали критерий Стьюдента на 5% уровне значимости.

Результаты и их обсуждение

В связи с перспективностью создания комплексных препаратов, в том числе синбиотиков, основанных на глубинном культивировании штаммов-продуцентов, использование совместного метода выращивания приобретает особую важность, поскольку отдельное культивирование бактерий, входящих в препарат, экономически менее выгодно.

Результаты проведенных экспериментов показали, что рост изучаемых штаммов бацилл в условиях совместного культивирования заметно активизировался в сравнении с культивированием их в монокультуре. Скорость роста смешанной культуры составила $0,807 \pm 0,015$ ч⁻¹ и превосходила этот показатель при отдельном культивировании штаммов *B. subtilis* 5139 и *B. subtilis* 5140 ($0,776 \pm 0,013$ и $0,751 \pm 0,010$ ч⁻¹ соответственно). Максимальная концентрация накапливаемой в этих условиях биомассы жизнеспособных клеток находилась на уровне $8,5 \pm 0,11 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, что в 1,1–1,3 раза было выше, чем при выращивании штаммов в монокультурах.

Известно, что регуляция активности ферментов может осуществляться на уровне их биосинтеза или изменения активности [15]. Ранее нами показано, что синтез секретируемых бациллами гидролаз при выращивании их в монокультурах зависит от условий культивирования, состава среды, ее основных источников питания, и кислотности [1, 10]. Было установлено, что изучаемые штаммы на ранее оптимизированной для них среде, в состав которой в качестве источника углерода была взята целлюлоза, продуцируют целлюлазный комплекс, представляющий собой сложную систему отдельных компонентов, состоящий из 4 типов целлюлаз: C_x-, C₁-, C₂-ферментов и целлобиазы, способных расщеплять различные целлюлозные субстраты (карбоксиметилцеллюлозу, хлопковую вату, фильтровальную бумагу и целлобиозу соответственно).

Полагая, что интенсификация синтеза изучаемых экзоцеллюлаз у исследуемых штаммов бацилл может происходить за счет условий их культивирования, нами был исследован процесс синтеза целлюлолитических ферментов у бактерий при совместном росте, а также при внесении в среду различных по составу дисахаридов в качестве источников дополнительного углеродного питания (рис. 1). Представленные данные подтвердили возможность использования совместного культивирования изучаемых бактерий как для интенсификации накопления ими биомассы клеток, так и для биосинтеза ферментов в этих условиях. Совместное культивирование исследуемых штаммов практически не влияло на каче-



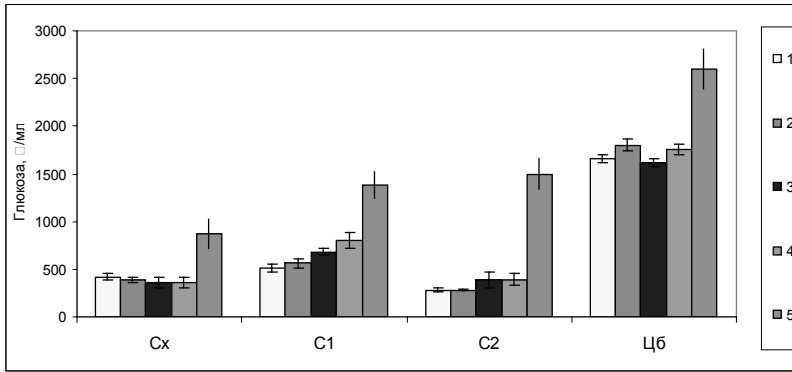


Рис. 1. Целлюлазная активность штаммов *B. subtilis* при раздельном и совместном культивировании на среде с целлюлозой и дополнительными источниками углерода

Обозначение вариантов эксперимента:

- 1 – *B. subtilis* 5139, 2 – *B. subtilis* 5140, 3 – штаммы 5139 +5140,
 4 – штаммы 5139 +5140 +лактит, 5 – штаммы 5139 +5140 +лактулоза.

Fig. 1. Cellulases activity of strains *B. subtilis* at in mono and joint cultivation on medium with cellulose and additional carbon sources

Notation of the variants of experiment:

- 1 – *B. subtilis* 5139, 2 – *B. subtilis* 5140, 3 – strains 5139 +5140,
 4 – strains 5139 +5140 +lactit, 5 – strains 5139 +5140 +lactulosa.

ственный и количественный состав получаемого при этом целлюлазного комплекса. При внесении в среду культивирования дополнительных источников углерода смешанная культура бацилл сохраняла активность ферментов C_x и целлобиазы, но при этом несколько увеличивала активность синтеза C₁- и C₂-ферментов. В отличие от лактита внесенная в среду лактулоза, имеющая в составе более доступные углеводы [10], способствовала повышению активности всех типов целлюлаз, продуцируемых штаммами бацилл при их совместном выращивании: в 1,5 и 1,7 раза активность целлобиазы и C₁-фермента и в 2,4 и 3,8 раза – C_x- и C₂- ферментов соответственно. Следовательно, полученные результаты дают основание полагать, что лактулозу и лактит можно использовать для выращивания продуцентов этих ферментов для создания на их основе комплексного синбиотического препарата, характеризующегося высокой целлюлолитической активностью.

Наряду с полученными результатами по изучению физиологии роста изучаемых культур и синтеза ими целлюлазного комплекса выявлено также их влияние на свойства секретируемого ими комплекса ферментов. Значения найденных для монокультур рН-оптимумов действия целлюлаз не изменялись при их совместном культивировании и находились в интервале рН 6,0–7,0 для C_x-, C₁- ферментов и целлобиазы и в более широкой зоне рН от 5,0 до 8,0 – для C₂-фермента. Однако, не изменяя рН культуральной среды, лактит и лактулоза влияли на энзиматические свойства целлюлазного комплекса в разной степени. Так, если на рН-оптимум C₂- фермента эти вещества в среде культивирования не влияли,

то рН-оптимум C_x -фермента и целлюбиазы сдвигался под их действием в более кислую область и находился уже в диапазоне рН 5,0–8,0. рН-оптимум C_1 - фермента сдвигался в ту же область рН лишь в присутствии в среде лактулозы (рис. 2).

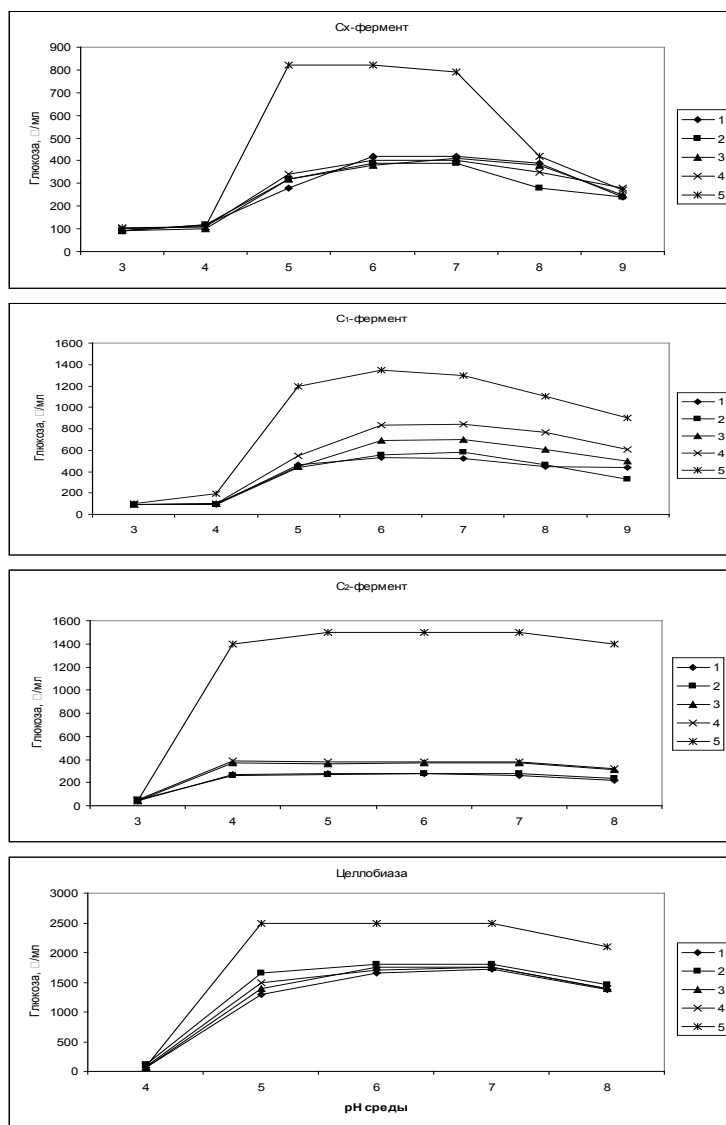


Рис. 2. Уровень рН-оптимума действия продуцируемых штаммами *B. subtilis* целлюлаз при культивировании в моно- и смешанной культурах
Обозначения: 1 – *B. subtilis* 5139, 2 – *B. subtilis* 5140, 3 – штаммы 5139+5140, 4 – штаммы 5139+5140+лактит, 5 – штаммы 5139+5140+лактuloза.

Fig. 2. The level of pH-optimum of the action of produced by strains *B. subtilis* cellulases at cultivation in mono- and joint cultures
Notations: 1 – *B. subtilis* 5139, 2 – *B. subtilis* 5140, 3 – strains 5139+5140, 4 – strains 5139+5140+lactit, 5 – strains 5139+5140+lactulosa.

При совместном культивировании изучаемых штаммов рН-стабильность целлюлолитических ферментов поддерживалась на том же уровне, что и в монокультурах. Выделяемые в этих условиях целлюлазы сохраняли свою активность при рН 6,0 даже после выдерживания культуральной жидкости при 12 °С в течение 24 часов: при этом потери активности составили лишь 7–12% от исходной (рис. 3).

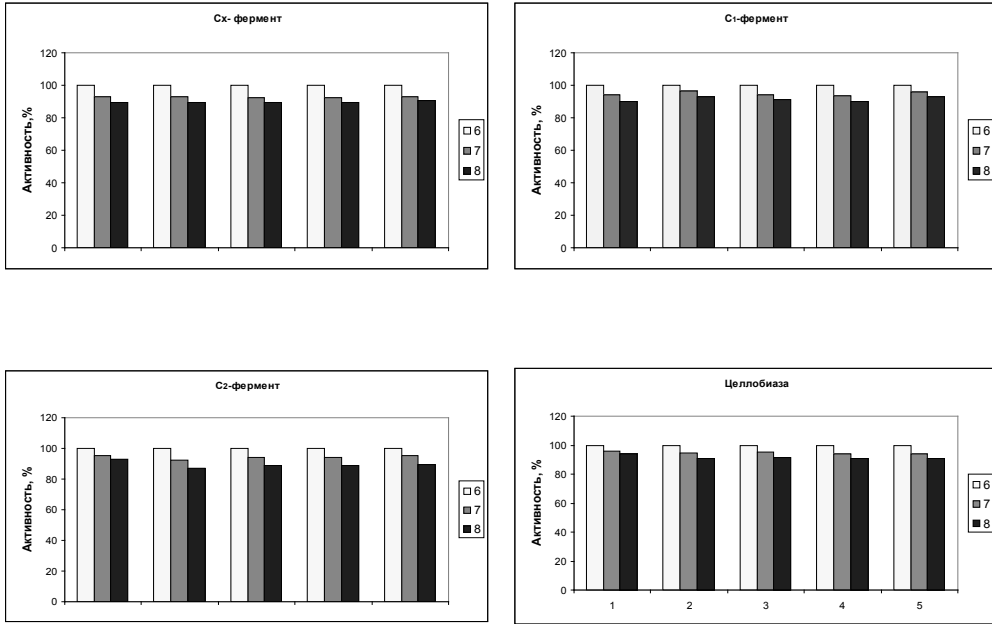


Рис. 3. Стабильность ферментов продуцируемого бациллами целлюлозного комплекса при рН-оптимуме 6,0 (принято за 100%)

Варианты эксперимента: 6 — исходная культуральная жидкость, 7 — после инкубации в течение 1 час, 8 — после инкубации в течение 24 час.

Обозначение 1–5 такое же, как на рис. 1.

Fig. 3. Stability of the enzymes of cellulitic complex produced by bacilli at pH optimum 6,0 (accepted for 100 %)

The variants of the experiment: 6 — initial medium liquid, 7 — at 1 hour of ageing per a cooler, 8 — at 24 hour of ageing per a cooler.

Notation 1–5 the same, as on fig. 1.

Температурный оптимум действия целлобиазы в монокультурах изучаемых бацилл находился при температуре 40 °С, для остальных типов целлюлаз — при 50 °С (эти значения были приняты за 100%). При совместном культивировании этот показатель не менялся и находился в тех же пределах температур (рис. 4). Не изменялся он и под влиянием вносимых в среду лактита и лактулозы.

У исследуемых штаммов при культивировании их монокультур наибольшая термостабильность S_x -фермента проявлялась в интервале тем-

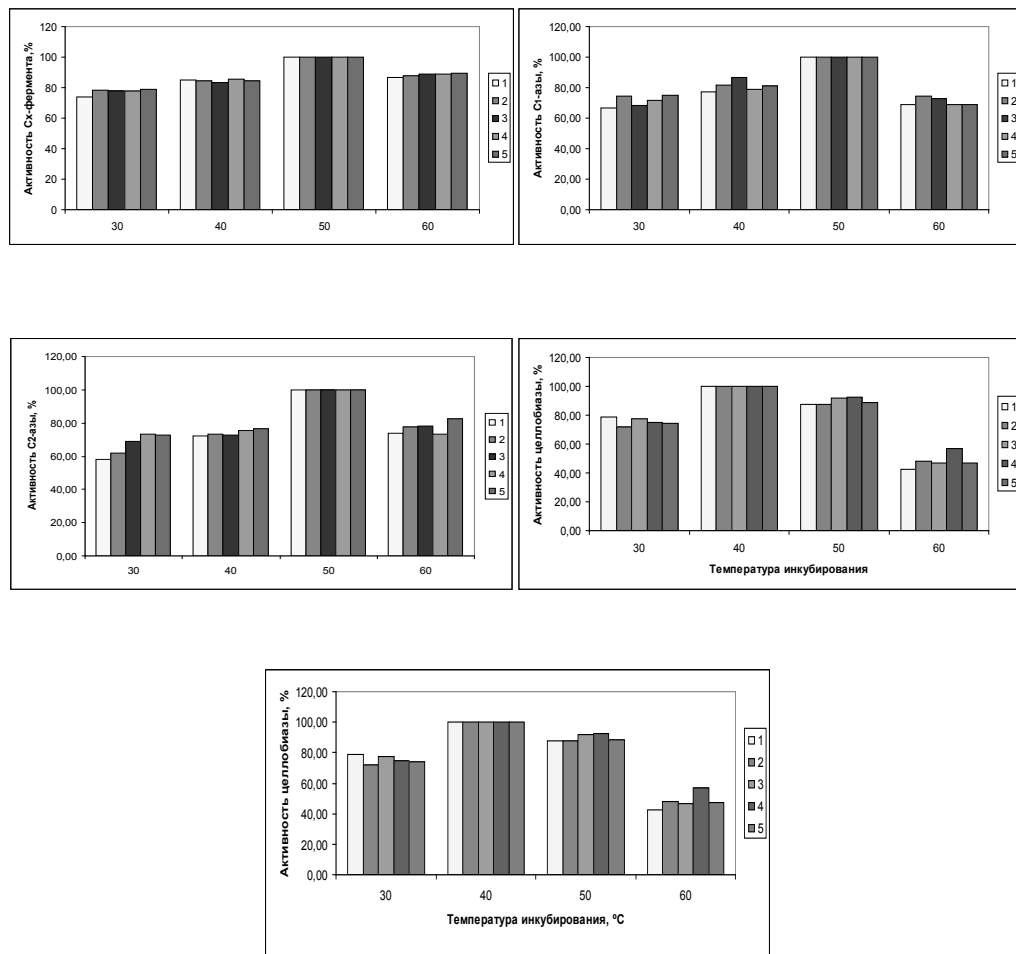


Рис. 4. Температурный оптимум действия различных целлюлаз, продуцируемых бациллами при культивировании их в моно- и смешанной культурах
Обозначение 1–5 такое же, как на рис. 1.

Fig. 4. Various cellulases temperature action optimum produced by bacilli at cultivation in mono- and joint cultures
Notation 1–5 the same, as on fig. 1.

ператур 40–50 °C. Остальные типы целлюлаз были стабильны в более широком интервале температур – от 40 до 70 °C (рис. 5). При совместном выращивании выделяемые бациллами целлюлазы сохраняли такую же, как и в монокультурах термостабильность. Так, после прогревания культуральной жидкости в течение 1 часа при 80 °C сохранялось еще до 50,0–60,0% активности C_x – фермента, до 78,0–99,0% – C_1 - и C_2 -ферментов и до 99% – активности целлобиазы. И даже при 100 °C (при кипячении культуральной жидкости в течение получаса) сохранялось еще до 25–32% исходной активности целлюлаз.

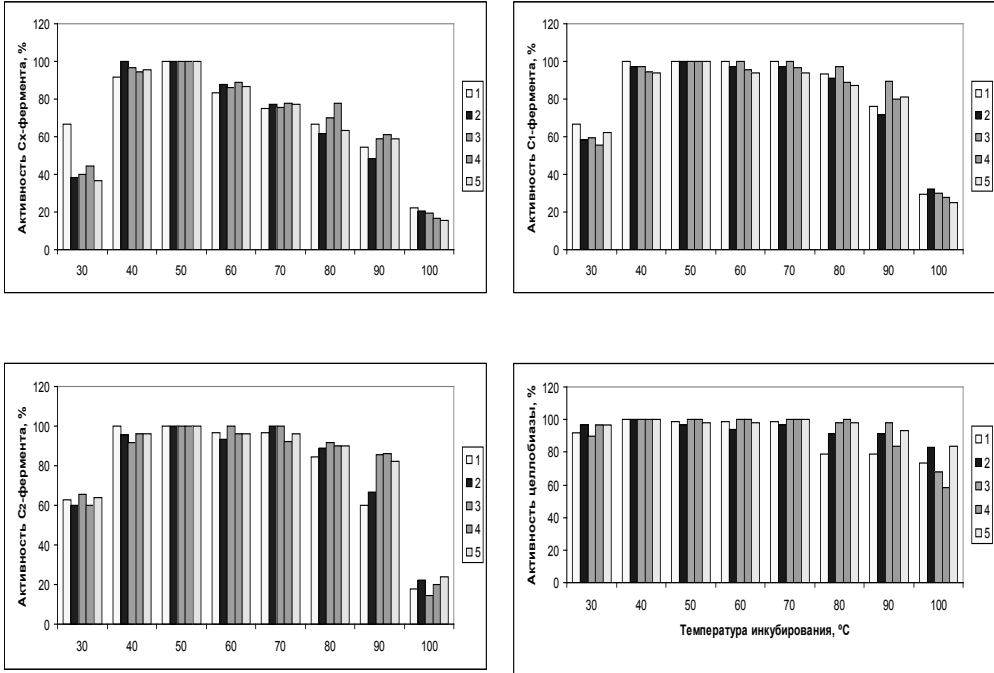


Рис. 5. Термостабильность целлюлаз штаммов *B. subtilis* при культивировании в моно- и смешанной культурах на средах с лактитом или лактулозой
Обозначение 1–5 такое же, как на рис. 1

Fig. 5. Cellulases thermostability of strains *B. subtilis* at cultivation in mono- and joint cultures on medium with additional of lactitol or lactuloses
Notation 1–5 the same, as on fig. 1.

Таким образом, результаты исследований показали возможность использования совместного культивирования изучаемых штаммов бацилл не только для увеличения накопления биомассы, но и для интенсификации процесса биосинтеза целлюлаз. Можно полагать, что полученные результаты могут быть использованы при разработке технологий получения новых биопрепаратов в основе с изучаемыми пробиотическими штаммами, выращиваемыми как отдельным, так и совместным способами глубинного культивирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеева Л.В., Осадча А.И., Сафронова Л.А., Иляш В.М., Хархота М.А. Синтез гідролітичних ферментів у бацил в залежності від складу поживного середовища // Мікробіологія і біотехнологія. — 2010. — № 1. — С. 44–52.
2. Бондаренко В.М., Воробьев А.А., Гершанович М.А., Мельникова И.Ю., Петров Л.Н. Обоснование и тактика назначения в медицинской практике

различных форм пробиотических препаратов // Сб. матер. конф. "Пробиотики, пребиотики и синбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы". М. 2004. — С. 5–6.

3. Видоградова С.П., Кушнир С.Н. Биосинтез гидролитических ферментов при совместном культивировании макро- и микромицетов // Прикладная биохимия и микробиология. — 2003. — Т. 39, № 6. — С. 652–655.

4. Кистень А.Г., Рой А.А., Курдиш И.К. Физиологическая активность смешанной культуры *Methylococcus capsulatus* УКМ В-3030 *Bacillus megaterium* УКМ В- 5723 и *Bacillus subtilis* ВКПМ В — 4189 при колонизации твердой поверхности // Микробиол. журнал. — 2002. — Т. 64, № 6. — С. 73–78.

5. Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А., Осадчая А.И., Калиновский Г.Н. Эндоспорин — новый эффективный препарат для лечения и профилактики послеродовых эндометритов и задержания последа у коров // Ветеринарная медицина. — 2004, Харьков. — В. 84. — С. 396–403.

6. Кульчицкая М.А. Разработка аппаратных методов совместного культивирования кишечных бактерий, применяемых при производстве окарина // Вест. ун-та Н.И. Лобачевского. Сер. Биология. — 2001. — № 1(3). — С. 90–92.

7. Логинова Л.Г. Микробиологические аспекты сверхсинтеза ферментов микроорганизмами // Изв. АН СССР. Серия биол. — 1989. — № 5. — С. 682–688.

8. Нуртдинова А.Н. Разработка и изучение биологических свойств комплексного препарата — бифидоспорина. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. —Уфа. 2003. — 22 с.

9. Острикова Н.А., Коновалов С.А. Биосинтез комплекса целлюлозо-разрушающих ферментов смешанным культивированием микроорганизмов // Биотехнология. — 1986. — № 3. — С. 62–68.

10. Полищук В.М. Лактит, можливість створення нових продуктів // Молочна промисловість. — 2003. — № 6(9). — С. 8–9.

11. Сафронова Л.А., Осадчая А.И., Иляш В.М. Синбиотики: перспективы создания на основе бактерий рода *Bacillus* и лактита // Лікарська справа. — 2007. — № 4. — С. 3–8.

12. Штанько Т.В. Біологічні властивості бацилл та лактобактерій, перспективних для створення комплексного пробіотика. Автореф. дис. ...канд. біол. наук. — К., 2009. —19 с.

13. Яковлева Е.П. Совместное культивирование продуцентов биологически активных веществ с другими организмами (обзор). // Прикладная биохимия и микробиология. — 1983. — № 3. — С. 330–347.

14. Bull A.T. Mixed microbial culture technology // Biochem. Soc. Trans. — 1984. — V. 12, № 6. — P. 1137–1140.

15. Ng T.K., Ben- Bassat A., Geikus G.Y. Ethanol production by Thermophilic Bacteria: Fermentation of cellulosic substrates by cultures of *Clostridium thermocellum* and *C. thermohydrosulfuricum* // Appl. Environ. Microbiol. — 1981. — 41, № 6. — P. 1337–1343.



UDC 579.152.3

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

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

BIOSYNTHESIS OF CELLULASES BY PROBIOTIC STRAINS *BACILLUS SUBTILIS* AT JOINT CULTIVATION

Summary

It is studied the growth of probiotic strains *B. subtilis* 5139 and *B. subtilis* 5140 and biosynthesis of extracellular enzymes of cellulases complex at deep cultivation on cellulose. It is shown the possibility of use of joint cultivation studied strains not for only intensification of cells biomass accumulation, but also for biosynthesis of extracellular cellulases, and possibility of addition of lactitol or lactuloses on cultivation medium as a source of carbon.

Key words: *Bacillus*, cellulases, joint cultivation.

УДК 579.152.3

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

БИОСИНТЕЗ ЦЕЛЮЛАЗ ПРОБИОТИЧНИМИ ШТАМАМИ *BACILLUS SUBTILIS* ПРИ СУМІСНОМУ КУЛЬТИВУВАННІ

Реферат

Вивчено ріст пробіотичних штамів *B. subtilis* 5139 і *B. subtilis* 5140 та біосинтез ферментів целюлазного комплексу, що виділяються ними в середовище, при глибинному способі культивування на целюлозі. Показано можливість використання сумісного культивування досліджуваних штамів не лише для інтенсифікації накопичення ними біомаси клітин, але і для біосинтезу позаклітинних целюлаз, у тому числі при додаванні в середовище культивування лактиту або лактулози як додаткових джерел вуглецю.

Ключові слова: *Bacillus*, целюлази, сумісне культивування.

