

**Л.В. Авдеева, А.І. Осадча, Л.А. Сафронова, В.М. Іляш,
М.А. Хархота**

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

СИНТЕЗ ГІДРОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ У БАЦИЛ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД СКЛАДУ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА

*Вдосконалено поживне середовище для біосинтезу різних гідролаз бактеріями роду *Bacillus* та вивчена активність синтезу ними складної системи гідролітичних ферментів, що пов'язано з особливостями складу поживного середовища. Не змінюючи якісного складу середовища для культивування, оптимізовано співвідношення її компонентів, що забезпечують підвищений біосинтез та активність позаклітинних ферментів складного гідролітичного комплексу. Встановлено, що для бацил при підвищенні їх гідролазної активності найбільш значущим є поєднання неорганічного і органічного джерел азоту.*

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

Відомо, що мікроорганізми здатні використовувати різні ростові полісахаридні субстрати та синтезувати при цьому комплекс різних гідролітичних ферментів.

За даними ряду дослідників гідролітичні ферменти, зокрема ферменти целюлозолітичного комплексу, ксиланази, ліпази та інші відносяться до індукцибельних ферментів, що і визначає різні вимоги до складу поживного середовища, на якому культивуються бактерії-продуценти [2, 5, 6, 7, 12].

Тому одним з шляхів підвищення біосинтетичної здатності бацил без зміни їх генетичного апарату є направлене регулювання процесів біосинтезу ферментів шляхом зміни саме складу та співвідношень компонентів поживного середовища, на якому вони вирощуються. Особливо це важливо для промислових продуцентів ферментів, в тому числі гідролаз.

Метою даної роботи було вивчення закономірностей біосинтезу різних гідролаз бактеріями роду *Bacillus* на відповідних специфічних вуглецевісних субстратах, удосконалення складу поживного середовища для забезпечення найбільш активного біосинтезу цих ферментів.

Матеріали і методи

В роботі використано 36 культур бактерій роду *Bacillus* з колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАНУ, що пройшли етапи скринінгу та відібрані за найвищою гідролітичною активністю.

Вирощування бактерій проводили на рідкому поживному середовищі, раніше оптимізованому нами для глибинного культивування бацил, яке забезпечує їх оптимальний ріст та накопичення біомаси [8], такого складу (у г/л): натрію 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, рН середовища — $7,0 \pm 0,2$. Це середовище було використано як вихідне для підвищення біосинтезу та активності гідролаз бактеріями роду *Bacillus*. З метою вдосконалення середовища, додавали відповідний специфічний для кожного з ферментів субстрат (у %): для отримання ксиланази — ксилан 1,0; целюлази (ендоглюканази) — Na-KMЦ (натрієву сіль карбоксиметилцелюлози) 0,5; β -глюкозидази — целобіозу 0,2; пектинази — пектин 0,5; ліпази — маслинову олію 0,5, який використовували також як джерело вуглецю. Культивування проводили протягом 48 год при 37°C в колбах ємністю 750 мл з 50 мл середовища на качалці з 200 об/хв. Після вирощування відокремлювали культуральну рідину від біомаси центрифугуванням при 6000 об/хв протягом 20 хв та визначали ферментні активності у відповідних супернатантах за загальноприйнятими методами [3, 9, 13].

Оптимізацію складу вищезазначеного поживного середовища проводили з використанням математичного методу планування експерименту — методу ортогональних латинських прямокутників для п'яти чинників (тобто компонентів середовища) на чотирьох рівнях (їх концентраціях) [1]. Згідно існуючій матриці планування перевірено 24 варіанти середовища для кожного ферменту з одночасним варіюванням концентрацій всіх п'яти компонентів середовища. Варіант вихідного середовища був контрольним. Значення досліджуваних рівнів концентрації компонентів середовища такі (у г/л): для цитрату натрію — від 0 до 1,93; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — від 1,18 до 5,9; KH_2PO_4 — від 2,4 до 12,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — від 0,09 до 0,225; для кукурудзяного екстракту, який був введений в середовище, — від 2,5 до 12,5.

Математичне опрацювання результатів експериментів полягало у розрахунку величин ефектів впливу кожної концентрації компоненту середовища на активність процесу біосинтезу ферментів, що розраховували за математичним плануванням експерименту [1].

Ріст бактерій на середовищах з різними субстратами оцінювали вимірюванням оптичної густини суспензії, що виросла, на фотоелектроколометрі ФЕК-56 при 540 нм, рН — потенціометрично. Для оптимізації середовища з метою вивчення ферментної активності спочатку використовували контрольні штами: *B. subtilis* МС-13₂, *B. subtilis* 55 ЛГ, *B. subtilis* 36ЛГ, *B. subtilis* 2Ш, які характеризувалися найвищою активністю щодо синтезу ксиланази та целобіази, целюлази, пектинази і ліпази, відповідно. В подальших дослідках на оптимізованих середовищах культивували решту штамів і потім порівнювали їх за активністю відповідного ферменту з контрольними штамами.

Одним з критеріїв, за допомоги якого оцінювали здатність вибірково відноситися до складу поживного середовища будь-якого з досліджуваних штамів бактерій до біосинтезу того або іншого ферменту, був також коефіцієнт Т [10], за значенням якого судили про ферментну активність.

Коефіцієнт Т по суті віддзеркалює відношення ферментативної активності кожної з досліджуваних культур в дослідних середовищах ($N_{\text{досл.}}$) з контрольним штамом на вихідному середовищі ($N_{\text{вих.}}$):

$$T = (N_{\text{досл.}} - N_{\text{вих.}}) / N_{\text{вих.}}$$



Результати та їх обговорення

Встановлено, що для синтезу ферментів склад середовища був схожим за якістю, а після оптимізації для кожного з них він відрізнявся за кількісним співвідношенням його компонентів (табл. 1).

Таблиця 1

Склад поживного середовища для синтезу гідролітичних ферментів бактеріями роду *Bacillus*

Table 1

Composition of nutrient medium for the synthesis of hydrolytic enzymes by bacteria of genus *Bacillus*

Компонент	Склад середовища (г/л)						Вихідне середовище
	Ендо- глюканаза	β-Глюко- зидаза	Ксила- наза	Пектиназа		Ліпаза	
				ПЕ	ПГ		
Цитрат натрію	1,29	1,29	0,645	1,93	1,29	1,29	1,29
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5,9	4,75	2,37	5,9	5,9	5,9	4,75
KH ₂ PO ₄	4,8	2,4	12,0	12,0	9,6	9,6	9,6
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,18	0,045	0,045	0,225	0,225	0,18	0,18
Кукурудзяний екстракт	12,5	10,0	5,0	5,0	5,0	5,0	-

З даних таблиці видно, що зниження у вихідному середовищі кількості солей амонію, магнію та цитрату за одночасного збільшення в ньому фосфатів стимулювало синтез ксиланаз досліджуваними штамами бацил, в той час як наявність в ньому більшої, ніж у контролі, кількості названих компонентів сприяла вже синтезу пектиназ. Для підвищення ж синтезу целюлаз в середовищі культивування бажана менша кількість солей фосфату. Крім того, для активного біосинтезу всіх досліджуваних гідролітичних ферментів бацилам необхідна обов'язкова наявність в середовищі кукурудзяного екстракту (5–12%).

Таким чином, в результаті проведених досліджень з оптимізації складу поживного середовища та розрахованих за ними ефектів впливу концентрації кожного з компонентів середовища на синтезувальну активність були встановлені їх оптимальні співвідношення для кожного з досліджуваних ферментів і на їх основі складені та реалізовані його нові варіанти.

З даних табл. 2 видно, що при знайденому співвідношенні компонентів середовища рівень ксиланаз, що секретується бактеріями, був вищим, ніж до оптимізації і склав 434,7±25,2 од/мл, що перевищувало активність контрольного штаму *B. subtilis* MC-13₂ на вихідному середовищі приблизно в 1,3 раза (328,4±15,1 од/мл).

Зміни у співвідношенні компонентів поживного середовища позитивно відбивалися також на збільшенні синтезу ферментів пектолітичного та целюлозолітичного комплексів. При цьому, ендоглюканазна активність контрольного штаму підвищилася в 5,4 раза, целобіазна активність — в 18,7 раза, ПЕ (пектинестерази) в 2,7 раза та ПГ (полігалактуронази) до 2,2 раза в порівнянні з активністю на вихідному середовищі. Активність синтезу ліпази підвищилася майже в 1,2 раза із збереженням достатньо високого рівня і продуктивності по біомасі з використанням в середовищі маслинової олії як єдиного джерела вуглецю.



Синтезувальна активність гідролаз штамами *Bacillus subtilis* на вихідному та оптимізованому середовищах

Table 2

Synthesis hydrolase activity by the strains of genus *Bacillus subtilis* on initial and optimised medium

Штам <i>B. subtilis</i>	Продукований фермент	Активність, од/мл	
		до оптимізації	після оптимізації
МС-13 ₂	ксиланаза	328±15,1	434,7±25,2
55 ЛГ	ендоглюканаза	1016,1±10,1	5526±12,5
МС-13 ₂	β-глюкозидаза	90,5±5,8	1690±31
36 ЛГ	пектинестераза	0,55±0,05	1,51±0,98
36 ЛГ	полігалактуроноза	3,2±0,11	7,2±0,86
2Ш	ліпаза	24,4±2,0	28,8±4,8

Таким чином, в результаті оптимізації середовища культивування шляхом підбору співвідношень його компонентів було отримано вищий рівень синтезу позаклітинних ферментів, ніж на вихідному середовищі, який істотно варіював у бактерій в залежності як від виду, так і від штаму. Серед всіх досліджуваних за рівнем активності найбільше відрізнялися штами, які продукували целюлазу в межах від 3519 до 18680 од/мл, що перевищувало в 3,5–29,2 рази активність контрольного штаму на середовищі до оптимізації. Бактерії також мали високу, практично однакового рівня, целобіазну активність — 1670–1870 од/мл, що перевищувало в 6–7 разів активність цього штаму на вихідному середовищі (90,5 од/мл).

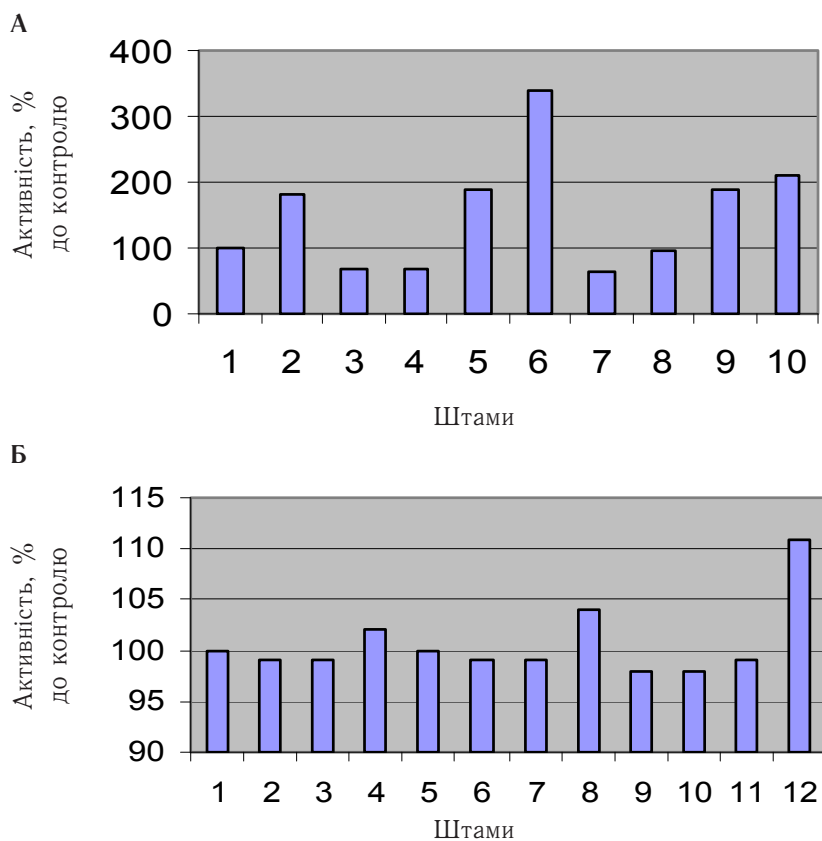
Порівняльний аналіз ферментної активності контрольних і досліджуваних штамів показав, що продукція ендоглюканаз штамом *B. subtilis* 229ж перевищувала рівень контрольного штаму на 82,3%, *B. subtilis* A_{5/1} — на 88,7%, *B. silvestris* A₁₀ — на 89,6% та штаму *B. licheniformis* A_{6/3} — на 111%, у решти штамів вона була нижчою. Рівень утворення целобіаз був вищим від контрольного тільки у трьох з досліджених штамів бактерій, але всього на 1,8–10,6% (рис. 1).

При культивуванні на оптимізованому середовищі бацили відрізнялися також різним рівнем синтезу ксиланаз та ліпаз (рис. 2). І хоча всі досліджувані штами, що вивчаються, мали здатність розщеплювати ксилан, рівень їх активності на цьому середовищі поступався активності контрольного штаму. Виключення представляв лише штам *B. subtilis* 80 ЛГ, який мав таку ж активність, як контрольний. Крім того, відрізнялися два штами *B. megaterium* 906 та *B. licheniformis* A_{6/3}, здатні продукувати позаклітинну ліпазу активніше за контрольний штам.

Щодо пектолітичного комплексу, то досліджувані штами бацил проявляли тільки на оптимізованому середовищі як пектинестеразну, так і полігалактуронозну активність. З існуючих даних літератури відомо, що рівень цієї активності, як правило, залежить від співвідношення різних типів пектиназ [4]. Нами показано, що штами бацил, культивування яких проводили на вихідному середовищі, взагалі не мали пектинестеразної активності.



Тоді як на оптимізованому середовищі співвідношення визначених пектиназ у досліджуваних штамів коливалося в межах від 0,5 до 55,6. Така розбіжність в коливанні, можливо, вказує на залежність синтезу пектиназ не стільки від штаму продуцента, скільки від способу та умов його культивування, чи від інших чинників [4].



А — целюлаза

Штами (10 шт.):

1 *B. subtilis* 55ЛГ (100%)

2 *B. subtilis* 229Ж

3 *B. subtilis* 30s

4 *B. subtilis* 1872

5 *B. subtilis* A_{5/1}

6 *B. subtilis* A_{5/2}

7 *B. cereus* 63/4

8 *B. oligonitrophilus* 5758

9 *B. silvestris* A₁₀

10 *B. licheniformis* A_{6/3}

Б — β-глюкозидаза

Штами (12шт.):

1 *B. subtilis* МС-13₂ (100%)

2 *B. subtilis* A_{5/1}

3 *B. subtilis* A_{5/2}

4 *B. subtilis* МС-2₂

5 *B. subtilis* МС-6₃

6 *B. subtilis* 45ЛГ

7 *B. subtilis* 49ЛГ

8 *B. subtilis* 51ЛГ

9 *B. subtilis* 39ЛГ

10 *B. silvestris* A₁₀

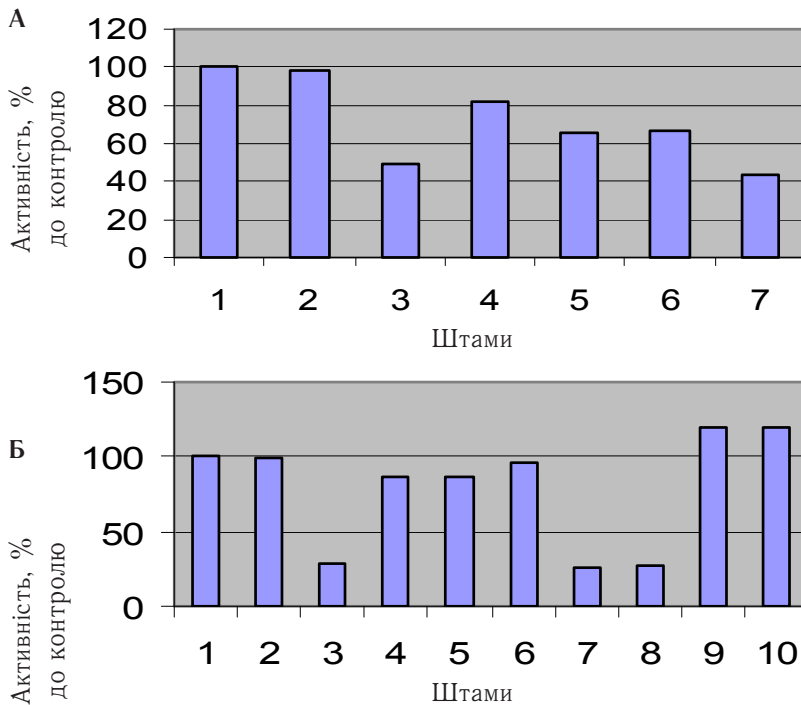
11 *B. licheniformis* A_{6/3}

12 *Bacillus* sp. A₇

Рис. 1. Синтез целюлаз штамми роду *Bacillus* на оптимізованому середовищі

Fig. 1. Synthesis of cellulase by the strains of genus *Bacillus* on the optimised medium





А — ксиланаза

Б — ліпаза

Штами (7 шт.):

Штами (10 шт.):

1 *B. subtilis* МС-13₂ (100 %)

1 *B. subtilis* 2Ш (100%)

8 *B. megaterium*

2 *B. subtilis* 80ЛГ

2 *B. subtilis* 39ЛГ

9 *B. megaterium* 906

3 *B. subtilis* 1155

3 *B. subtilis* 51ЛГ

10 *B. licheniformis* А_{6/3}

4 *B. subtilis* 39ЛГ

4 *B. subtilis* 36ЛГ

5 *B. subtilis* 51ЛГ

5 *B. subtilis* 1155

6 *B. megaterium* 906

6 *B. subtilis* 668

7 *B. licheniformis* А_{6/3}

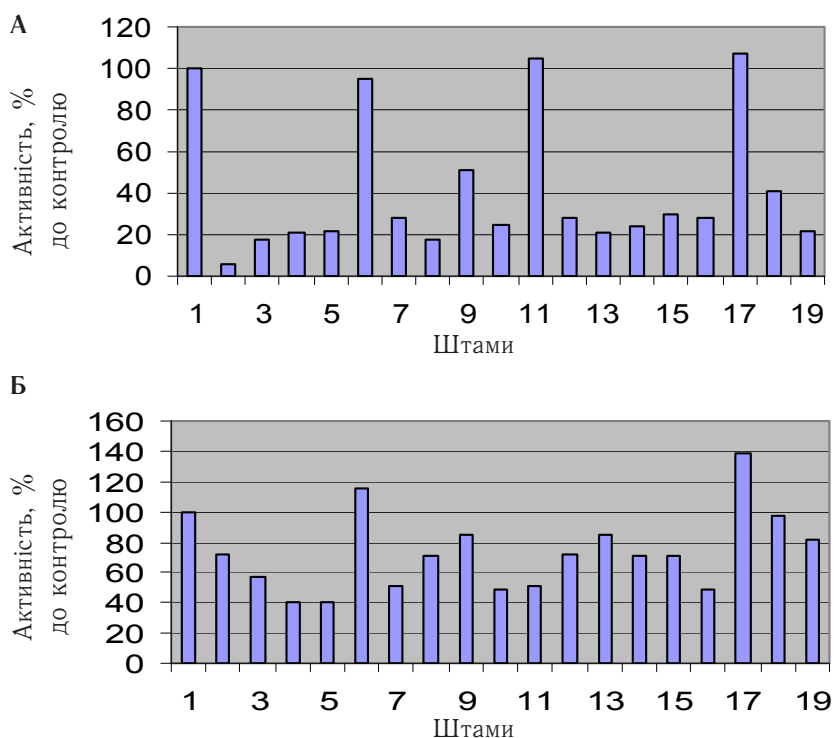
7 *B. subtilis* 19ЛГ

Рис. 2. Синтез ксиланаз (А) і ліпаз (Б) штамми роду *Bacillus* на оптимізованому середовищі

Fig. 2. Synthesis of xylanase (A) and lipase (B) by the strains of genus *Bacillus* on the optimised medium

Найбільш активним при синтезі обох ферментів виділився штам *B. megaterium* 906, який по ПЕ і ПГ перевершував контрольний на 6,6 і 38,9%, відповідно. Вище за контрольний по ПЕ були також штами *B. subtilis* 1701 (на 4,6%), а по ПГ штам *B. subtilis* 39ЛГ на 15,3% (рис. 3).

При порівнянні синтезувальної активності решти досліджуваних штамів, встановлено, що коефіцієнт Т по ксиланазі знаходився в межах значень від -0,35 до +0,09, по ліпазі — від -0,65 до +0,41, по ендоглюканазі — від +2,4 до +17,4, целобіази — від +17,3 до +19,7, по ПЕ — від -0,05 до +2,97, по ПГ — від -0,09 до +2,12. Отримані значення коефіцієнта Т дали можливість підтвердити те, що досліджувані штами бактерій, використовуючи для біосинтезу специфічні субстрати, здатні синтезувати гідролітичні ферменти: ксиланози, ліпази, целюлази та пектинази.



- | | | |
|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------|
| 1 <i>B. subtilis</i> 36ЛГ (100%) | 7 <i>B. subtilis</i> 51ЛГ | 13 <i>B. licheniformis</i> MC13 ₁ |
| 2 <i>B. subtilis</i> 29ЛГ | 8 <i>B. subtilis</i> 83ЛГ | 14 <i>B. licheniformis</i> A _{6/3} |
| 3 <i>B. subtilis</i> 30 ЛГ | 9 <i>B. subtilis</i> 1155 | 15 <i>B. cereus</i> 504 |
| 4 <i>B. subtilis</i> 34ЛГ | 10 <i>B. subtilis fuscus</i> | 16 <i>B. cereus</i> 444 |
| 5 <i>B. subtilis</i> 49ЛГ | 11 <i>B. subtilis</i> 1701 | 17 <i>B. megaterium</i> 906 |
| 6 <i>B. subtilis</i> 39ЛГ | 12 <i>B. licheniformis</i> 5510 | 18 <i>B. pumilus</i> 21 |
| | | 19 <i>B. pulvifaciens</i> |

Рис. 3. Синтез пектиназ (А – пектинестераза, Б – полігалактураназа) штамами роду *Bacillus* при культивуванні на оптимізованому середовищі

Fig. 3. Synthesis of pectynase (A – pectynesterasa, B – polyhalactouronasa) by the strains of genus *Bacillus* at cultivation on the optimised medium

Разом з тим мікроорганізми по-різному реагували на співвідношення компонентів в оптимізованому середовищі, на що і вказує коефіцієнт Т зі знаком «+» або «-». Коефіцієнт Т був використаний нами як додатковий показник для виявлення найбільш активних штамів бацил за найбільшою абсолютною величиною та знаком «+».

Таким чином, отримані нами результати та їх статистичний аналіз підтвердили необхідність і важливість для біосинтетичної активності бактерій роду *Bacillus* всіх компонентів, що входять до складу поживного середовища для їх культивування, і при цьому дозволили виділити серед них основні, додавання яких призводило до найбільш позитивних ефектів. Такими були кукурудзяний екстракт та $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Поєднання джерел азоту (амонійного і амінного) виявилось найбільш сприятливим



і необхідним для активного синтезу ферментів бацилами. В літературі є чимало даних, що свідчать на користь цього чинника, котрий підсилює синтез ферментів у інших мікроорганізмів [5, 7, 11].

Узагальнюючи отримані результати, можна констатувати, що не змінюючи якісного складу вихідного поживного середовища можна зробити раціональнішим співвідношення його компонентів, що дозволяє забезпечити активний біосинтез бацилами позаклітинних ферментів складного гідролітичного комплексу. Дані літератури та власні дослідження свідчать про перспективність використання бацил для отримання комплексу гідролітичних ферментів не тільки шляхом підбору штамів, що продукують ці ферменти, але й вдосконаленням повноцінності середовищ для їх культивування, в тому числі у промисловому виробництві.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бирюков В.В. Практическое руководство по применению математических методов планирования эксперимента для поиска оптимальных условий в многофакторных процессах — Рига: Зинатне, 1969. — 79 с.
2. Иванова Н.П., Ерохина Л.И., Морозова Е.С. Сравнительное изучение способности различных бактериальных культур синтезировать целлюлолитические ферменты // Прикладная биохимия и микробиология. — 1977. — Т. 13, № 4. — С. 552–558.
3. Лифшиц Д.Б. Методы определения пектолитической активности препаратов плесневых грибов // Унифицирование методов определения активности ферментных препаратов производственного назначения. — Киев. — УкрНИИТИ. — 1967. — 42 с.
4. Лобанок А.Г., Астапович Н.И., Михайлова Р.В., Павловская Ж.И. Регуляция образования пектолитических и целлюлолитических ферментов микроорганизмами // Проблемы биоконверсии растительного сырья. М.: Наука, 1986. — С. 192–214.
5. Логинова Л.Г., Иванова И.И., Гужова Э.П., Храпцова Г.И., Исмаилова Д.Ю., Бурденко Л.Г. Целлюлазы термофильных микроорганизмов // Проблемы биоконверсии растительного сырья. М.: Наука, 1986. — С. 165–191.
6. Махсумханов А.А., Якубов И.Т., Давранов К.Д. Условия культивирования и биосинтез липаз грибом *Penicillium melinii* УзЛМ-4 // Прикладная биохимия и микробиология. — 2003. — Т. 39, № 1. — С. 47–51.
7. Мухамеджанова Т.Г., Безбородов А.М. Влияние источника азота и углерода на накопление липазы грибом *Rizopus oryzae* 1414 // Прикладная биохимия и микробиология. — 1982. — Т. 18, в. 1. — С. 16–22.
8. Осадчая А.И., Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А. Стимуляция роста и спорообразования *Bacillus subtilis* оптимизацией углеводного питания при глубинном культивировании // Прикладная биохимия и микробиология. — 1997. — 33, № 3. — С. 321–324.
9. Рухлядева А.П., Полюгалина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. М.: Легк. и пищ. Промышленность, 1981. — 288 с.
10. Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Гончарук Ю.Н., Дробот Е.И. и др. Кислородзависимая и нитроксидзависимая ферментная системы макрофагов при стафилококковой и листериозной инфекциях // ЖМЭИ. — 2006. — № 3. — С. 39–43.
11. Теоретические и прикладные аспекты синтеза ферментов микроорганизмами. Под ред. М.В. Залашко. Минск: Наука и техника, 1982. — С. 121–133.
12. Штейн И.В., Арендс И.М., Сорокина Т.А., Горшкова Е.В., Калуняц К.А. Отбор микроорганизмов, синтезирующих щелочную липазу // Биотехнология. — 1989. — Т. 5, № 2. — С. 133–136.
13. Ota V., Yamada Y. Lipase from *Candida paraliopolytica*. Part 1. Anionic surfactants as the essential activator in the systems emulsified by polyvinyl alcohol // Agric. Biol. Chem. — 1966. — V. 30, № 4. — P. 351–358.



УДК 579.152.3

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

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН
Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина,
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: safronova_larisa@ukr.net

СИНТЕЗ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ У БАЦИЛЛ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Реферат

Усовершенствована питательная среда для биосинтеза разного типа гидролаз бактериями рода *Bacillus*, а также изучена активность синтеза ими сложной системы гидролитических ферментов, что связано с особенностями состава питательной среды. Не меняя качественный состав среды для культивирования, оптимизированы соотношения ее компонентов, обеспечивающие повышенный биосинтез и активность внеклеточных ферментов сложного гидролитического комплекса. Установлено, что для бацилл при повышении их гидролазной активности наиболее значимым является сочетание неорганического и органического источников азота.

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

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

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Zabolotny str., Kyiv,
D 03680, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 23 29, e-mail: safronova_larisa@ukr.net

SYNTHESIS OF HYDROLYTIC BACILLI ENZYMES DEPENDING ON NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION

Summary

Nutrient medium for the biosynthesis of different hydrolases type by bacteria of genus *Bacillus* has been improved. Activity of synthesis by bacilli strains of the complex system of hydrolases relating with the peculiarity of nutrient medium composition has been studied. The nutrient proportion of growth medium has been optimized for providing the increasing biosynthesis and activity of extracellular enzymatic hydrolytic complex. It was established that the most significant for increasing of bacilli hydrolase activity was combination of inorganic and organic nitrogen sources.

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

