

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, Д 03680, Украина,
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: avdeeva@imv.kiev.ua

ЛИПОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Проведен поиск продуцентов экзолипаз среди 353 штаммов бактерий рода Bacillus. Показано, что 62,0% штаммов бацилл способны к гидролизу оливкового масла и твинов. Лучшие всего гидролизовали эти субстраты штаммы видов B. subtilis, B. licheniformis, B. cereus и B. megaterium. У видов B. brevis, B. bombycis, B. lentus эта способность отсутствовала вообще. Однако только 19,5% штаммов гидролизовали оливковое масло. Исходя из различной субстратной специфичности, условно выделены 4 группы штаммов бактерий. Наиболее перспективными и наиболее продуктивными представляются третья группа – штаммы, способные гидролизовать твины и оливковое масло, и четвертая группа – штаммы, эффективно гидролизующие только оливковое масло. Показано, что оливковое масло в концентрации 0,5% способно усиливать рост и накопление биомассы бактерий, но резко снижать их липазную активность. Действие синтетических твинов на липазную активность бактерий неоднозначно: у одних штаммов оно стимулирующее, у других – ингибирующее.

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

Микробные липазы являются обширной, крайне разнообразной по своим свойствам группой промышленно важных ферментов. Кроме общебиологического, они имеют большое практическое значение при решении широкого спектра задач в промышленности и здравоохранении: в процессах модификации и переэтерификации жиров, синтеза сложных эфиров, для удаления маслянистых веществ в сточных водах, в производстве моющих средств, для улучшения усвояемости кормов, при лечении расстройств пищеварения, при заболеваниях печени, желчного пузыря, поджелудочной железы [1, 2, 4, 6, 8, 9]. И хотя изучению липаз посвящено немало работ [3, 7, 8, 10, 11, 13, 14], продолжается поиск высокоэффективных продуцентов этих ферментов среди микроорганизмов различных систематических групп, в том числе среди бактерий рода *Bacillus*.

Цель настоящей работы заключалась в поиске активных продуцентов липаз среди бактерий рода *Bacillus*, отборе наиболее перспективных штаммов для возможного использования в различных отраслях народного хозяйства, а также изучение их активности при выращивании в глубинных условиях на различных субстратах.

Материалы и методы

Объектом исследований липолитической активности были 353 штамма 23 видов бактерий рода *Bacillus* из коллекции отдела антибиотиков Института микробиологии и вирусологии НАН Украины, изолированных из различных эконисш (почвы, лечебные грязи, желудочно-кишечный тракт животных и людей и другие).

Скрининг активных по липазам культур проводили в два этапа. Первый этап заключался в прямом отборе активных культур разных видов бактерий из их посевов на поверхность агаризованной среды со специфическим для них субстратом в качестве источника углерода. Образование и активность ферментов липолитического комплекса оценивали по появлению отчетливых зон деэтерифицированного субстрата: оливкового масла или твинов 40 и 80 (по 0,5%), после 2-суточного инкубирования при 37 °С на МПА с добавлением CaCl_2 [12].

Потенциальными продуцентами липаз считали те культуры бактерий, которые при росте на агаризованной среде образовывали вокруг колоний непрозрачный ореол, появляющийся за счет кристаллов нерастворимых кальциевых солей жирных кислот, освобождаемых из субстрата в процессе липолиза. По размерам зон гидролиза субстрата (в мм по диаметру) судили об активности ферментов, образуемых бациллами на соответствующих субстратах. Специфичность действия липаз отражалась на характере образования зон, что выражалось в различной степени помутнения и появления характерного для каждого субстрата рисунка на агаризованных средах: для твина 40 — игольчатые ореолы; для твина 80 и оливкового масла — в виде веточек, точек и т. п.

Для исследования ферментативной активности штаммов, отобранных в результате первого этапа, бактериальные культуры выращивали в колбах емкостью 750 мл в условиях аэрации на качалке (200 об/мин) при 37 °С в течение двух суток с 50 мл жидкой синтетической среды следующего состава (в 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, рН среды — $7,0 \pm 0,2$ с добавлением оливкового масла или твинов (0,5% в 1/15 М фосфатном буфере, рН 7,0). По окончании ферментации в бесклеточном фильтрате определяли активность липаз титрометрическим методом с использованием 40% эмульсии оливкового масла в 2% водном растворе поливинилового спирта [12]. Реакционная смесь содержала 1 мл супернатанта культуральной жидкости, 2 мл 1/15 М фосфатного буфера с рН 7,0 и 2,5 мл эмульсии оливкового масла. Реакцию проводили при перемешивании в течение 1 ч



при 37 °С. Для прекращения гидролиза в среду вносили 15 мл этанола. Продукты гидролиза оттитровывали 0,05 н раствором NaOH до pH 9,0 с использованием потенциометра.

Липазную активность (ЛА) рассчитывали по формуле:

$$ЛА = (A - A_1) \cdot 50 / B,$$

где A и A_1 — количество мл 0,05 н NaOH, пошедшей на титрование опытного и контрольного образца соответственно; B — количество фермента (в виде культуральной жидкости) в реакционной смеси, мл; 50 — коэффициент для пересчета миллилитров щелочи в микромоли олеиновой кислоты, найденный расчетным путем [12]. Липазную активность выражали в ед/мл (1 ед=1 мкмоль олеиновой кислоты).

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с помощью компьютерной программы Excel 2003.

Результаты и их обсуждение

Полученные результаты показали, что способность гидролизовать исследуемые субстраты свойственна далеко не всем исследуемым видам бацилл. Из числа проверенных штаммов бактерий только 62,0% (218 штаммов) были способны к гидролизу исследуемых субстратов. 33,7% проявляли способность к гидролизу твина 40, 29,7% — твина 80 и лишь 19,5% — оливкового масла. Лучше всего гидролизировали эти субстраты штаммы видов *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. circulans*, и *B. megaterium*. У культур остальных видов прослеживалась невысокая липазная активность, а у видов *B. brevis*, *B. bombycis*, *B. lentus*, *B. alvei*, *B. polymyxa*, *B. thuringiensis*, *B. firmus*, *B. pasteurii*, *B. pulvifaciens*, *B. oligonitrofilus* и *B. silvestris* — способность к гидролизу этих субстратов вообще отсутствовала.

Из всех субстратов слабее всего бациллы гидролизировали оливковое масло, лучше всего — твин 40 (эфир пальмитиновой кислоты) и твин 80 (эфир олеиновой кислоты), что по данным некоторых исследователей зависит от длины углеродной цепочки и степени насыщенности жирных кислот в их составе [10]. Такие отличия в липазной специфичности микроорганизмов в литературе объясняются различной проницаемостью клеточных стенок под действием испытываемых субстратов и отсюда различным выходом низкомолекулярных веществ в окружающую среду [3, 6].

Полученные экспериментальные результаты по первичному скринингу позволили из наиболее активных штаммов (141 штамм) условно выделить несколько групп бактерий, способных расщеплять одновременно несколько субстратов (табл.). Один и тот же штамм мог войти в разные или только в одну группы.

К первой группе отнесены 17% от всех активных на этих субстратах штаммов, которые способны гидролизовать только твины 40 и 80. Из них 87,5% штаммов относились к виду *B. subtilis*, которые на этих субстратах

образовывали зоны гидролиза, в основном, диаметром 10–20 мм, и лишь 9 штаммов из них — зоны выше 20 мм.

Ко второй группе отнесены 16 штаммов, которые способны гидролизовать оливковое масло и твин 80 и образовывать зоны гидролиза до 20 мм, и лишь 4 штамма — зоны выше 20 мм.

Таблица

Бактерии рода *Bacillus*, наиболее активные по липазе

Table

Bacteria of genus *Bacillus* the most active of lipases

Вид <i>Bacillus</i>	Абсолютное количество штаммов в группах							
	I твин 40 и 80		II твин 80 и оливковое масло		III твины и оливковое масло		IV оливковое масло	
	диаметр зон просветления, мм							
	до 20	выше 20	до 20	выше 20	до 20	выше 20	до 20	выше 20
<i>B. subtilis</i>	15	6	6	-	3	7	21	5
<i>B. licheniformis</i>	-	-	6	2	3	5	3	15
<i>B. cereus</i>	-	-	-	2	-	6	1	9
<i>B. megaterium</i>	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>B. pumilus</i>	-	-	3	-	2	-	3	1
<i>B. circulans</i>	-	-	-	-	-	1	1	2
<i>B. alvei</i>	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>B. coagulans</i>	-	-	-	-	1	-	2	-
<i>B. firmus</i>	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>B. lateresporus</i>	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>B. badius</i>	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>Bacillus spp.</i>	-	1	-	-	-	-	3	-
Всего	15	9	16	4	9	19	35	34

Примечание: «—» — способность к гидролизу отсутствует.

The note: “—” — the ability of hydrolysis is absent.

В третью группу вошли штаммы разных видов бацилл, способные гидролизовать все исследуемые субстраты. Эта группа, по нашему мнению, представляется наиболее перспективной и наиболее продуктивной. В нее вошли 19,8% штаммов: 9, которые образовывали зоны просветления до 20 мм, и 19 штаммов — зоны выше 20 мм.

Немаловажное значение имела также четвертая группа, куда отнесены штаммы, способные гидролизовать только оливковое масло. Ферменты, синтезируемые на этом субстрате, принято называть истинными липазами [5]. Таких штаммов среди бацилл обнаружено 49% от всех активных. Наиболее активными продуцентами истинных липаз среди исследуемых были 26 штаммов *B. subtilis* из 228, 18 штаммов *B. licheniformis* из 25, 10 штаммов *B. cereus* из 24, 4 штамма *B. pumilus* из 14, 3 штамма



B. circulans из 4, 3 штамма *Bacillus spp.* из 15, 2 штамма *B. coagulans* и по 1 штамму *B. firmus* и *B.adius*.

Можно предположить, что те представители бацилл, которые вошли в IV и III группы, и могут стать потенциальными продуцентами липолитических ферментов на субстратах, содержащих олеиновую кислоту [1, 9].

Таким образом, данные, полученные в результате первого этапа скрининга, позволяют отметить присутствие различной специфичности экзолипаз у бактерий рода *Bacillus*. Не исключено, что способность внеклеточных липаз расщеплять те или иные субстраты или несколько различающихся по жирнокислотному составу субстратов, может быть следствием сложности состава липазного комплекса, то есть наличия у бацилл нескольких типов липаз с разными свойствами и разных по действию [14].

Учитывая то, что размеры зон гидролиза могут зависеть не только от активности секретируемых в среду ферментов, но и от скорости диффузии их в среду, от типа субстрата и ряда других факторов, были выбраны штаммы, которые характеризовались наибольшей активностью гидролиза исследуемых субстратов, для последующей количественной оценки липазной активности их при глубинных условиях культивирования на жидких средах.

Проверенно 146 штаммов, способных образовывать зоны гидролиза тех или иных субстратов. Между величиной зон гидролиза на плотной среде и активностью культур на жидкой среде не всегда наблюдалась корреляция. Возможно, что положительный результат при качественном анализе в некоторых случаях может объясняться дополнительным действием неспецифических эстераз, активность которых в жидких средах не определялась.

Несмотря на то, что внимание многих исследователей все больше привлекает направленный микробный биосинтез ферментов, действие таких субстратов как природные масла и различные твины на рост и образование липаз бациллами мало изучено. Механизмы индукции и регуляции активности липаз до конца не выяснены. В то же время имеются данные о том, что такие субстраты могут оказывать не только стимулирующее, но и ингибирующее действие на рост и липазную активность у микроорганизмов [1, 6, 12].

В результате изучения влияния оливкового масла, являющегося одним из наиболее характерных субстратов липолитических ферментов, показано, что оливковое масло в концентрации 0,5% усиливало накопление биомассы в 2 раза (рис. 1). В то же время, этот субстрат оказывал ингибирующее действие на синтез липаз. По сравнению с активностью бактерий, выращенных на среде с другими субстратами, относительная липазная активность в присутствии масла снижалась в среднем на 30% и более (рис. 2). Видимо, в результате гидролиза оливкового масла, ко-



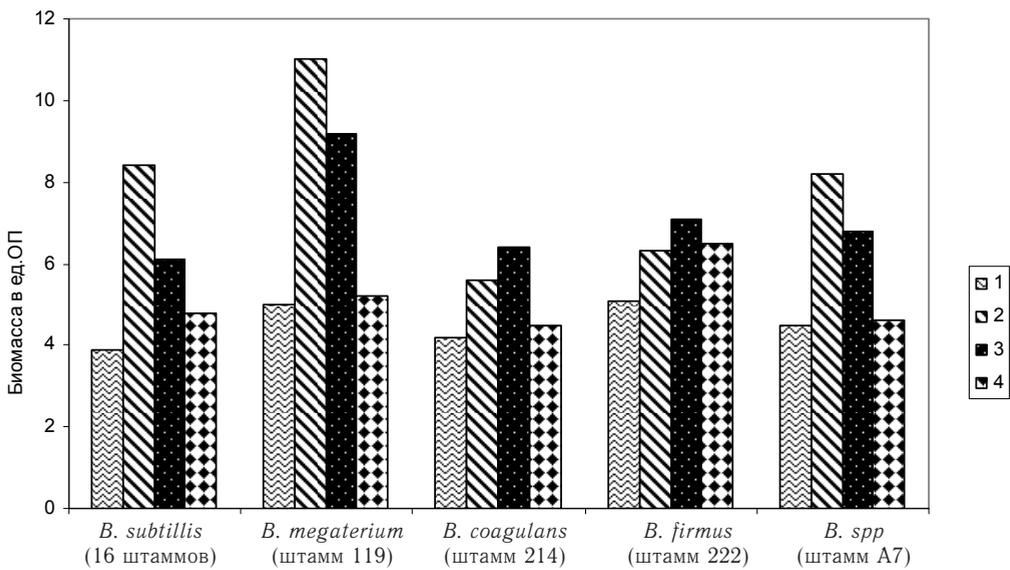


Рис. 1. Влияние оливкового масла и твинов в питательной среде на рост бацилл
 Обозначения: 1 – среда без субстратов (контроль), 2 – среда с оливковым маслом,
 3 – среда с твином 40, 4 – среда с твином 80.

Fig. 1. Influence of olive oil and twins on bacilli growth in a nutrient medium
 Designations: 1 – medium without substrata (control), 2 – medium with olive oil,
 3 – medium with twin 40, 4 – medium with twin 80.

торое состоит из 85% ненасыщенных кислот, в частности олеиновой, в среде, в основном, накапливается олеиновая кислота, которая и ингибирует синтез липазы. Отсутствие стимулирующего действия оливкового масла на активность липазы было отмечено для других микроорганизмов, причем степень ингибирования возрастала по мере увеличения длины углеродной цепи жирной кислоты [1, 6].

Полученные результаты указывают на неоднозначность действия твинов на липазную активность бактерий рода *Bacillus*, что многими исследователями связывается, в основном, с изменением клеточных мембран под их влиянием и связанным с этим повышенным выходом ферментов в культуральную жидкость. Как видно из рис. 2, твин 80 у одних видов исследуемых бактерий (*B. coagulans*, *Bacillus spp.*) повышал активность липазы на 40–150%, у других *B. megaterium*, *B. firmus* – снижал ее до 30%. Такое различие в действии особенно четко наблюдается среди 16 изучаемых штаммов *B. subtilis*: 11 из них способны разлагать твин 80 с активностью, на 50% превышающей контроль, другие же 5 штаммов с активностью, ниже на 30%.

У штаммов *B. megaterium*, *B. firmus* и меньшей части культур *B. subtilis* активность липаз подавлялась на 20–30% по сравнению с контрольной средой. У штаммов *B. coagulans*, *Bacillus spp.* и большинства

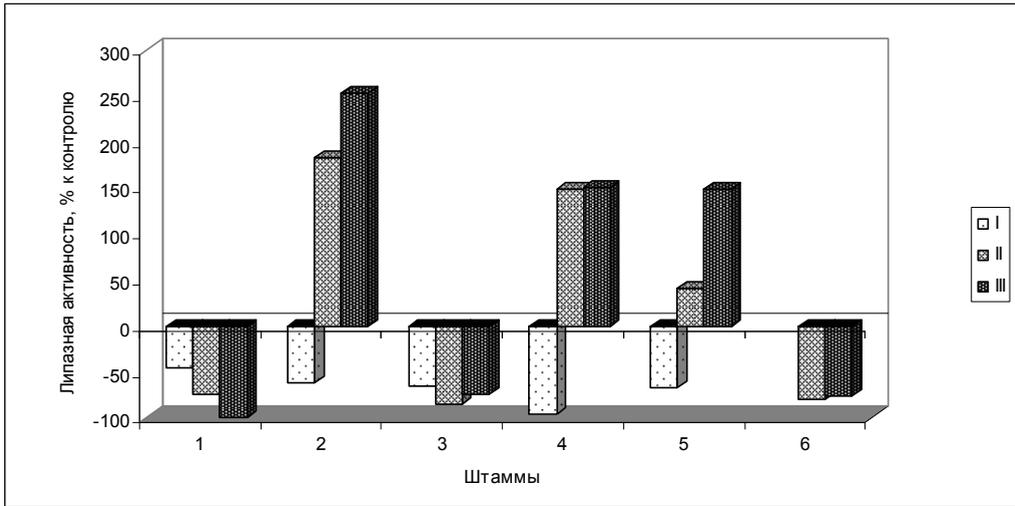


Рис. 2. Влияние оливкового масла и твинов на липазную активность бацилл

Субстраты: I – оливковое масло, II – твин 40, III – твин 80.

Штаммы: 1 – *B. megaterium* 6; 2 – *B. coagulans* 32; 3 – *B. firmus* 37; 4 – *Bacillus* spp. A7; 5 – *B. subtilis* – 16 штаммов (12 штаммов на II, 11 на III субстрате – стимулирующее действие, 16 штаммов на I, 4 на II, 5 на III субстрате – ингибирующее действие).

Fig. 2. Influence of olive oil and twins on bacilli lipases activity

Substrata: I – olive oil, II – twin 40, III – twin 80.

Strains: *B. megaterium* 6; 2 – *B. coagulans* 32; 3 – *B. firmus* 37; 4 – *Bacillus* spp. A7; 5 – *B. subtilis* – 16 strains (12 strains on II, 11 strains on III substrate – stimulated, 16 strains on I, 4 strains on II, 5 strains on III substrate – inhibited).

штаммов *B. subtilis* твины 40 и 80 способствовали повышению липазной активности штаммов на 30–150%. Рост же всех штаммов бацилл, как правило, усиливался под воздействием изучаемых субстратов, что подтверждает то, что твины являются хорошими индукторами липаз различных микроорганизмов [6, 12]. Наряду с этим однако имеются также данные об их ингибирующем действии [6]. В литературе имеются сообщения, что липазы *B. subtilis* лучше гидролизуют твины, содержащие насыщенные жирные кислоты, чем растительные масла, содержащие ненасыщенные кислоты [3].

Различный характер действия твинов авторы объясняют зависимостью от их природы, а также ролью в дисперсности при образовании эмульсии на поверхности раздела жир–вода [3]. Нельзя не учитывать, что липазы действуют только на поверхности раздела жир–вода, а твины, введенные в питательную среду, как лучшие, чем масла эмульгаторы, понижают поверхностное натяжение на границе жир–вода, что способствует образованию эмульсии более доступной действию липаз. Отсюда неоднозначное действие нерастворимых природных масел и водорастворимых синтетических твинов. К тому же известно, что твины хорошо растворяются в воде и потому их использование является более легким, чем нерастворимых масел.

Таким образом, учитывая то, что истинными субстратами липаз являются нерастворимые в воде жиры и масла, при проведении поиска активных продуцентов липолитических ферментов среди микроорганизмов, наиболее ценными можно считать результаты, полученные при использовании именно природных субстратов. Из исследованных штаммов различных видов бацилл, синтезирующих липазы, было отобрано для дальнейших исследований 5 штаммов, способных активно продуцировать достаточно высокие количества этого фермента при выращивании в глубинных условиях на среде с оливковым маслом в качестве специфического субстрата.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Безбородов А.М.* Биотехнология продуктов микробного синтеза. — М.: Агропромиздат, 1991. — 238 с.
2. *Давранов К.* Микробные липазы в биотехнологии (обзор). // Прикл. биохимия и микробиология. — 1994. — Т. 30, № 4–5. — С. 527–534.
3. *Марченкова А.И., Лобырева Л.Б.* Липолитическая активность спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* 100 и 207 // Биосинтез и метаболизм липидов у микроорганизмов: Тез. докл. III Всес. конф. (12–14 ноября 1979 г., М.), 1979. — С. 130–132.
4. *Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н.* Биохимическая переработка жиров и масел в новые липидные продукты с улучшенными биологическими и физико-химическими свойствами (обзор) // Прикл. биохим. и микробиол. — 2002. — Т. 38, № 5. — С. 469–481.
5. *Рид Дж.* Ферменты в пищевой промышленности. Перевод с англ. Р.В. Фениксовой. М.: Пищ. пром., 1971. — 414 с.
6. *Рубан Е.Л.* Микробные липиды и липазы. — М.: Наука, 1977. — 218 с.
7. *Смирнов В.В., Слабоспицкая А.Т., Крымовская С.С., Резник С.Р.* Липолитическая активность спорообразующих аэробных бактерий, выделенных из различных источников // Микробиологический журнал. — 1988. — Т. 50, № 2. — С. 6–11.
8. *Pat 6171848 США МПК⁷ А 23 К 1/10, А 01 N 63/00.* Enzyme — producing strain of *Bacillus* bacteria / Lawler D., Smith S., Rolbic L. опубл. 09.01.01.
9. *Borgstrom B., Brockman H.L.* Lipases. Ametrdam; New York; Oxford: Elsevier, 1984. — 527 p.
10. *Elwan S.H., El-Hoseiny M., Ammar M.S., Mostafa S.A.* A Lipases production by *Bacillus circulans* under mesophilic and osmophilic conditions, factors affecting lipases production // J. bacteriol. virol. et immunol. — 1983. — Т. 76, № 7/12. — P. 187–199.
11. *Haba E., Bresco O., Ferrer C., Marques A., Busquets M., Manresa A.* Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil



as selective substrate // Enzyme and Microb. Technol. — 2000. — V. 26, № 1. — С. 40—44.

12. 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.

13. Ruiz C., Pastor F.J., Diaz P. Izolation of lipid- and polysaccharide-degrading microorganisms from subtropical forest soil and analysis of lipolytic strain *Bacillus* sp. CK -179 // Lett. Appl. Microbiol. — 2005. — V. 40, № 3 — P. 218—227.

14. Sekhon Anurag, Dahiya Neetu, Tiwari Ram P., Hoondal Jurinder S. Properties of a thermostable extracellular lipase from *Bacillus megaterium* AKJ-1 // J. Basic. Microbiol. — 2005. — V. 45, № 2. — С. 147—154.

УДК 577.152.3

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

ЛИПОЛИТИЧНА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРИЙ РОДУ *BACILLUS*

Реферат

Проведено пошук продуцентів екзоліпаз серед 353 штамів бактерій роду *Bacillus*. Показано, що 62,1% штами бацил здатні до гідролізу маслинової олії та твінів. Краще всього гідролізували ці субстрати штами видів *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* і *B. megaterium*. У видів *B. brevis*, *B. bombycis*, *B. lentus* ця здатність була відсутня взагалі. Проте тільки 19,5% штамів гідролізували маслинову олію. Виходячи з різної субстратної специфічності, умовно виділено 4 групи штамів бактерій. Найбільш перспективними і найбільш продуктивними представляються третя група — штами, що здатні гідролізувати твіни та маслинову олію, і четверта група — штами, що ефективно гідролізують тільки маслинову олію. Показано, що маслинова олія в концентрації 0,5% здатна посилювати ріст і накопичення біомаси бактерій, але різко знижувати їх ліпазну активність. Дія синтетичних твінів на ліпазну активність бактерій неоднозначна: у одних штамів вона стимулююча, у інших — інгібуюча.

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



UDC 577.152.3

**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 24 09, e-mail: avdeeva@imv.kiev.ua

LIPASES BACTERIA ACTIVITY OF GENUS *BACILLUS*

Summary

There have been screened the producers of exsolyases among 353 strains of bacteria of genus *Bacillus*. There has been shown that 62.1% of strains of *Bacillus* are capable of hydrolysing of olive oil and twins. *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* and *B. megaterium* hydrolyzed these substrata the most actively. This ability was absent at *B. brevis*, *B. bombycis*, *B. lentus*. However only 19.5% of strains hydrolyzed olive oil. Four groups of bacteria strains were identified on the basis of different substrate specificity. The third group – strains, capable of hydrolysing of twins and olive oil, and the fourth group – strains, capable of hydrolysing only olive oil are the most perspective and the most productive. There has been shown that olive oil in concentration of 0.5% is capable of stimulating growth and biomass accumulation of bacteria, but inhibiting lipases activity. Synthetic twins influenced on the activity of lypases of bacteria ambiguously: at one strains it was stimulated, at others – inhibited.

Key words: bacteria of genus *Bacillus*, exsolipases.

