

УДК 577.152.3

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

ПЕКТОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

*Исследована способность синтезировать внеклеточные пектолитические ферменты с широким спектром действия у 353 штаммов бактерий рода *Bacillus* чашечным и титровальным методами. Показано, что большая часть исследованных бактерий способна синтезировать и выделять в среду полигалактуроназу (60,6% исследованных штаммов), и лишь 13,9% из них выделяли в среду пектинэстеразу. Установлено, что активность пектинрасщепляющих ферментов у бацилл различна и зависит от состава питательной среды.*

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

В стенках клеток и в межклеточных прослойках высших растений как в корнеплодах, так и в стеблях и фруктах присутствуют тяжелоразрушаемые пектины [6]. Содержание этих веществ в растительном материале не превышает 1%, но тем не менее они обеспечивают целостность клетки, являясь ее цементирующим материалом, и играют особо важную роль в метаболизме резервных веществ [3]. Пектиновые полисахариды достаточно хорошо изучены вследствие их широкого использования в различных отраслях пищевой и перерабатывающей промышленности в процессах размягчения плодов.

Распад пектиновых полисахаридов катализируется микроорганизмами с помощью двух групп пектолитических ферментов: пектинэстеразы и полигалактуроназы. Последовательным действием этих ферментов достигается полное разложение пектиновой молекулы. Пектинэстераза (ПЭ) катализирует омыление метильных эфирных групп галактуроновой кислоты и широко распространена в основном в клетках растений. Полигалактуроназа (ПГ) осуществляет гидролитические расщепление 1,4-глюкозидных связей между молекулами галактуроновой кислоты и найдена в основном в микроорганизмах. Оба фермента высокоспецифичны и зависят от условий культивирования и наличия в среде необходимого субстрата.

© Л.В. Авдеева, А.И. Осадчая, Л.А. Сафронова, В.М. Иляш, М.А. Хархота, 2010



На сегодняшний день промышленные препараты пектиназ производят только из грибов. В то же время значимое место среди возможных продуцентов пектолитических ферментов занимают бактерии и среди них бактерии рода *Bacillus* [2, 7, 12]. Согласно имеющимся литературным данным, хотя и довольно противоречивым, бациллы вида *B. subtilis* обладают выраженной способностью синтезировать пектолитические ферменты. Однако по данным некоторых исследователей эти бактерии не всегда способны продуцировать оба типа пектиназ, одни — лишь только пектинэстеразу или полигалактураназу [4], другие способны синтезировать и полигалактураназу, и пектинэстеразу [5, 11].

Важность поиска таких штаммов определяется практической задачей, перспективностью использования ферментных препаратов в разных отраслях народного хозяйства, основанных на переработке растительного сырья, повышении биологической ценности кормов или разложения растительных остатков в почве. На практике во ВНИИ виноградарства и виноделия "Магарач", Грузинском НИИ пищевой промышленности и Краснодарском комбинате биохимических и витаминных препаратов уже установлена высокая эффективность пектолитических препаратов на основе грибов в повышении биологической ценности кормов [2]. И если для снижения вязкости яблочного сока наиболее эффективными являются препараты, обладающие активностью как пектинэстеразы, так и полигалактураназы, то для обработки земляники, винограда нужны препараты в основном с высокой полигалактураназной активностью. Сфера применения пектолитических ферментов расширяется. Они уже находят свое применение в медицинской промышленности для получения ряда ценных лекарственных соединений. Поэтому все еще сохраняется потребность поиска новых продуцентов пектолитических ферментов.

Целью настоящей работы являлось сравнительное изучение пектинолитической активности различных видов бактерий рода *Bacillus*, а также изучение влияния состава среды на образование этих ферментов в условиях глубинного культивирования.

Материалы и методы

Объектом исследований пектолитической активности были 353 штамма 23 видов рода *Bacillus* с 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 пектиназам 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, как источником углерода. Образование и активность ферментов пектолитического комплекса оценивали по их действию на пектин по появлению отчетливых зон деэтерифицированного



пектинового субстрата (0,5%) после 2-суточной инкубации при 37 °С на МПА. Под действием метилового красного через 1–2 часа под влиянием образующейся галактуроновой кислоты вокруг выросших колоний появлялись молочно-белые зоны различного диаметра. Под действием бромтимолового синего, который также применяли для окрашивания, проявлялись прозрачные синеватые зоны.

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 течении двух суток на жидкой синтетичной среде 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, pH среды — $7,0 \pm 0,2$ с добавлением яблочного пектина (0,5% в 0,5 М цитратно-фосфатном буфере, pH 5,0).

По окончании ферментации в бесклеточном фильтрате определяли титрометрическим методом активность пектинэстеразы (ПЭ) по нарастающему количеству карбоксильных групп и активность полигалактуроназы (ПГ) по учету количества образующихся альдегидных групп [1].

За единицу пектолитической активности принимали количество фермента, которое катализировало за 1 час при 37 °С распад 1 г пектина и выражали числом условных единиц в 1 мл культуральной жидкости (ед/мл).

Результаты и их обсуждение

Активные штаммы бактерий на агаризованной среде вследствие расщепления пектина под влиянием синтезируемых ими пектолитических ферментов образовывали зоны просветления двух типов: прозрачные зоны с бледно-синим ореолом, которые через несколько часов теряли четкость контуров, и/или четкие стойкие зоны с бело-молочным ореолом. Отличались зоны также по диаметру и контрастности и выявлялись в разные сроки, что, возможно, является отражением степени активности разных типов пектиназ, составляющих пектолитический комплекс. Неактивные культуры не образовывали зон гидролиза.

Установлено, что 60,6% штаммов бацилл обладали способностью разлагать пектин. Среди них наиболее активно гидролизировали пектин, образуя на этом субстрате различные зоны, штаммы вида *B. subtilis* (69,7%). Из них у 40 штаммов этого вида зоны имели достаточно большой диаметр (20–25 мм) (табл.). Эту группу культур можно считать наиболее активной и практически значимой, так как они располагают разным набором пектолитических ферментов и способны наиболее полно расщеплять пектиновый субстрат.

Достаточно активными в расщеплении пектина были также штаммы *B. licheniformis*. Штаммы этого вида также образовывали зоны, разные по диаметру, а 5 штаммов из них были наиболее активными и давали оба типа зон.



Таблица

Table

Пектиназная активность различных видов бактерий рода *Bacillus*Pectinases activity of different bacteria species of genus *Bacillus*

Вид <i>Bacillus</i>	Общее количество штаммов	Активные штаммы										Неактивные штаммы		
		Зоны с бледно-синим ореолом, мм					Зоны с молочным ореолом, мм					Зоны с синим и молочным ореолом, мм		Неактивные штаммы
		Всего штаммов	до 10	до 20	выше 20	Всего штаммов	до 10	до 20	выше 20	Всего штаммов	до 20	выше 20		
<i>B. subtilis</i>	228	118	19	60	39	41	4	21	16	40	18	22	69	
<i>B. licheniformis</i>	25	13	3	6	4	12		4	8	5	3	2		
<i>B. cereus</i>	24	1			1	6		5	1	1	1		17	
<i>B. megaterium</i>	13	2	2	2	1	2		2					9	
<i>B. pumilus</i>	14	1			1	4		3	1				9	
<i>B. coagulans</i>	3	1	1										2	
<i>B. circulans</i>	4					2		1	1				2	
<i>B. alvei</i>	3					1			1				2	
<i>B. polymyxa</i>	2												2	
<i>B. brevis</i>	3					1			1				2	
<i>B. thuringiensis</i>	2												2	
<i>B. firmus</i>	2	1		1									1	
<i>B. laterosporus</i>	2												2	
<i>B. sphaericus</i>	2												2	
<i>B. badius</i>	1												1	
<i>B. bombycis</i>	1												1	
<i>B. lentus</i>	1	1		1									-	
<i>B. pasteurii</i>	1												1	
<i>B. macerans</i>	2												2	
<i>B. pulvifaciens</i>	1					1		1						
<i>B. species</i>	15	2	1	1									13	
<i>B. oligonitrophilus</i>	3	2	2	2		1		1						
<i>B. silboestris</i>	1	1	1											
Всего	353	143	24	74	45	71	5	37	29	46	22	24	139	



У представителів видів *B. polymyxa*, *B. thuringiensis*, *B. laterosporus*, *B. sphaericus*, *B.adius*, *B. bombycis*, *B. pasteurii*, *B. macerans* не встановлено наявності пектолітичних ферментів. У видів *B. firmus*, *B. lentus*, *B. silvestris*, *B. coagulans* активними були по одному штаму.

В останнє час все більше уваги приділяється пошукам продуцентів з широким спектром внекліткових пектиназ. Відомо, що повне розкладання пектинової молекули досягається лише послідовним дією двох типів пектиназ. Полигалактураноаза діє на нерозчинні форми пектина середньої рослинної пластинки, а пектинестераза доповнює і посилює дію полигалактураноази.

Таким чином, в результаті проведених досліджень показано, що бацили різних видів мають неоднакову по ступеню пектолітичної активності. При цьому 143 штаму (40,5%) з них формували тільки прозорі зони, 71 штаму (20,1% від всіх досліджуваних) — зони з молочним ореолом і тільки 46 штаму з досліджуваних формували і те і інші зони, а 139 штаму бацил (39,4%) виявилися взагалі не здатними розщеплювати пектиновий субстрат.

Штаму, які формували і інші зони і найбільшого діаметра (20 мм і більше), були обрані для наступного етапу скринінгу з метою встановлення закономірностей синтезу і проявлення пектолітичної активності у досліджуваних бактерій при їх глибокому культивуванні в середовищах, де в якості єдиного джерела вуглецю використовували глюкозу, пектин або обидва джерела разом.

Більшість штаму в середовищі з пектином характеризувалися більш активним синтезом полигалактураноази, ніж в середовищі з глюкозою, що є підтвердженням індукованого характеру синтезу цього ферменту у досліджуваних бактерій і узгоджується з наявними даними для більшості інших мікроорганізмів [2—4, 6, 10].

В той же час 74 штаму різних видів бацил полигалактураноазу синтезували більш активно в середовищі без пектина. Очевидно, ПГ у цих культур є конститутивним ферментом. Подібні повідомлення також мають [9, 13]. Отже, при вивченні властивостей мікроорганізмів, що продуцують пектолітичні ферменти, необхідно обов'язково враховувати їх здатність змінювати свій обмін в залежності від складу середовища і умов культивування.

І незважаючи на те, що в пектолітичному комплексі досліджуваних бацил виявлено ПЗ в значно менших кількостях, ніж ПГ (в 5—36 і більше разів), таке наявність її в препаратах дуже важливо, оскільки за даними ряду дослідників вона гідролізує пектин в 1000 разів швидше і глибше порівняно з ПГ, а в поєднанні з ПГ вона значно посилює розщеплення пектинового субстрату. Однак існують і інші повідомлення, що наявність цього ферменту в препаратах в значних кількостях не завжди бажано, так як, відщепляючи

метоксильные группы в пектиновых веществах, он может способствовать накоплению нежелательного токсичного метанола [11].

Из штаммов бацилл, синтезирующих ПЭ, было отобрано для дальнейшей работы 12 штаммов, способных продуцировать достаточно высокие количества этого фермента, и 7 штаммов бацилл, активных только по ПГ, а также 14 штаммов, активных и по ПЭ, и по ПГ.

Таким образом, исследуемые бактерии обладают в целом выраженной пектолитической активностью. Эти ферменты различаются между собой по механизму действия и субстратной специфичности. Исходя из этого, можно предвидеть, что включение ферментных препаратов из бацилл, активных как по ПЭ, так и ПГ в корм животным, должно способствовать снижению в нем вязкости пектиновых веществ, увеличению количества растворимых веществ и повышению его усвояемости в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Лифшиц Д.Б.* Методы определения пектолитической активности препаратов плесневых грибов // Унифицирование методов определения активности ферментных препаратов производственного назначения. К.: УкрНИИНТИ, 1967. — 42 с.
2. *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.
3. *Лобанок А.Г., Бабицкая В.Г., Богдановская Ж.Н.* Микробный синтез на основе целлюлозы : Белок и другие ценные продукты. — Минск: Наука и техника, 1988. — 261 с.
4. *Микробные ферменты и биотехнология.* Под ред. В.М. Фогарти. М.: Агропромиздат, 1986. — 208 с.
5. *Рид Дж.* Ферменты в пищевой промышленности. М.: Пищевая промышленность, 1971. — 44 с.
6. *Фениксова Р.В.* Биосинтез ферментов микроорганизмами // Ферменты микроорганизмов. М.: Наука, 1973. — 58 с.
7. *Gierasimiuk J., Strzelczyk E.* Cellulolytic and pectolytic activity of bacilli isolated from the root-free soil and the rhizosphere of different forest trees // Folia forest. pol. A. — 2003. — № 45.— P. 15–26.
8. *Kashyap D.R., Chandra S., Kaul A., Tewari R.* Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus sp.* DT7 // World. J. Microbiol. and Biotechnol. — 2000. — V. 16, № 3. — P. 277–282.
9. *Kelly C.T., Fogarty W.M.* Production and properties of polygalacturonatatelyase by an alkalophilic microorganism *Bacillus sp.* RK9 // Can. J. of microbiol 1978. — V. 24, № 10, — P. 1164–1172.



10. Li Li-heng, Lan Shi-le, Cao Xing-zhi, Xie Da-ping. Оптимальные условия для определения пектиназы и ксиланазы у *Bacillus circulans* // J. Hutnan. Agr. Univ. — 2005. — V. 31, № 3. — P. 304–306.

11. Samuel K.C., Gabriel M. Pectic Enzyme Activities of Bacteria Associated with Rotted Onions (*Allium cepa*) // Appl. and Environ. Microbiol. — 1981. — V. 42, № 4. — P. 585–589.

12. Tamburini E., Leon A.G., Perito B., Mastromei Y. Characterization of bacterial pectinolytic strains involved in the Water retting process // Environ. Microbiol. — 2003. — V. 5, № 9. — С. 730–736.

13. Ward O.P., Fograry W.M. Polygalacturonase lyase production by *Bacillus subtilis* and *Flavobacterium pectinovorum* // Appl. Microbiol. — 1974. — V. 27. — P. 346–350.

УДК 577.152.3

Л.В. Авдеєва, 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

ПЕКТОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДА *BACILLUS*

Реферат

Досліджена здатність синтезувати позаклітинні пектолітичні ферменти з широким спектром дії у 353 штамів бактерій роду *Bacillus* чашковим і титрувальним методами. Показано, що велика частина досліджених бактерій здатна синтезувати і виділяти в середовище полігалактуранази (60,6% досліджених штамів), і лише 13,9% з них виділяли в середовище пектинестеразу. Встановлено, що активність пектинрозщеплюючих ферментів у бацил різна і залежить від складу поживного середовища.

Ключові слова: пектинази, бактерії роду *Bacillus*.



UDC 577.152.3

**L.V. Avdeeva, A.I. Osadchaya, 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

PECTOLITIC BACTERIA ACTIVITY OF GENUS *BACILLUS*

Summary

There have been investigated the ability of synthesising of extracellular pectolitic enzymes with a wide spectrum among 353 strains of genus *Bacillus*. There have been shown that the most of them (60.6% of investigated strains) are capable to synthesising and allocating the polyhalactouronases in the medium, and only 13.9% of them allocated the pectynesterases in the medium. There have been established that activity of pectolytic enzymes of bacilli is different and depends upon nutrient of the medium.

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

