

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ  
ЖУРНАЛ**

**ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК**

**КИЕВ — 198**

## ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА ЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ СПОРОВЫМИ ТЕРМОФИЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Н. З. Тиньянова, И. Н. Павлова, Л. Г. Жолнер

Ин-т микробиологии и вирусологии АН УССР, Киев

Термофильные штаммы бактерий рода *Bacillus* синтезируют внеклеточные ферменты, лизирующие подавляющее большинство грамотрицательных бактерий, а также дрожжи из родов *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodospiridium*. Качественный и количественный состав комплекса литических ферментов зависит от состава среды и условий культивирования продуцентов. Активный биосинтез литических ферментов исследованными штаммами осуществляется на средах, содержащих один из следующих источников углерода и азота: дрожжевые клетки, гидролизаты дрожжей, соевую муку, кукурузную муку. Максимальная дрожжелитическая активность термофильных штаммов наблюдается при менее интенсивной аэрации, чем максимальная бактериолитическая.

Все возрастающий интерес к ферментам литического действия объясняется их перспективностью для создания безотходных и малоотходных технологий, в частности в микробиологической промышленности. Обычно для утилизации микробной биомассы требуется деградация клеточных стенок микроорганизмов, принадлежащих к различным таксономическим группам. Производимые у нас в стране, а также за рубежом препараты литических ферментов обладают узкой специфичностью в отношении лизируемых микроорганизмов и, как правило, деструктурируют грамположительные бактерии [2]. Поэтому не уменьшается потребность в расширении ассортимента ферментов литического действия.

Высокоактивные в отношении грамотрицательных бактерий и некоторых видов дрожжей литические ферменты были обнаружены нами [3, 4] у ряда термофильных штаммов бацилл. Ферменты этих микроорганизмов могут представлять практический интерес не только благодаря их широкой специфичности, но также и благодаря повышенной термостабильности, что обычно свойственно ферментам термофилов.

Настоящая работа посвящена установлению условий, оптимальных для биосинтеза литических ферментов термофильными бациллами.

**Материал и методы.** Продуценты литических ферментов (11 штаммов термофильных бацилл), принадлежащих к видам *Bacillus subtilis* (шт. 13, 66, 68, 111, 120), *B. circulans* (шт. 12, 49, 51, 90) и *B. licheniformis* (шт. 86, 94), выращивали, как правило, на среде, содержащей 2% сухих пекарских дрожжей в качестве единственного источника углерода и азота [3]. Культивирование обычно вели при 45°C глубинным способом в колбах на качалках (180 об/мин) или в ферментерах системы «Biotec» (полезная емкость 1,5 л) с перемешиванием 200—300 об/мин и подачей воздуха 1 объем на 1 объем среды в 1 мин.

Активность роста штаммов учитывали методом высева на чашки. Литическую активность культуральной жидкости определяли турбидиметрическим методом и выражали в процентах изменения оптической плотности взвеси живых клеток тест-культур [6]. В качестве последних были использованы представители родов *Pseudomonas*, *Proteus*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Methylomonas*, *Methylococcus*, а также дрожжи родов *Candida*, *Saccharomyces* и *Rhodospiridium* (всего 47 штаммов). Проба объемом 2 мл содержала 0,1—0,2 мл культуральной жидкости продуцента, 1 мл взвеси клеток тест-культуры с оптической плотностью 0,8—1,0 при 540 нм и 0,05 М трис-НСl-буфер. Реакцию проводили при температуре 60°C в течение 30 мин.

**Результаты и их обсуждение.** При определении литических свойств исследуемых термофилов в качестве тест-культур были избраны микроорганизмы, имеющие определенную практическую значимость в народнохозяйственной деятельности человека или же играющие существенную роль при поддержании биологического равновесия в природе. Так, использованные дрожжи являлись продуцентами кормового белка, каротиноидов, высокоактивными возбудителями бродильных процессов. Бактерии были представлены патогенными и условно патогенными видами, продуцентами белка, молочнокислыми культурами, используемыми для профилактики и лечения дисбактериозов молодняка сельскохозяйственных животных, а также метанокисляющими организмами.

Полученные результаты показали, что практически все штаммы исследованных споровых бактерий обладают литическими свойствами и многие из них характеризуются широким спектром действия. Наиболее выраженные литические свойства выявлены нами у видов *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* и *B. circulans* (табл. 1).

Следует подчеркнуть, что все изученные штаммы лизировали живые клетки дрожжей родов *Candida* и *Rhodospiridium*, в меньшей степени — *Saccharomyces*. Особенно активными они были по отношению к грамотрицательным бактериям. Степень лизиса большинства этих культур достигала 50—60 % за 15—30 мин инкубации с культуральной жидкостью продуцента, разведенного в 20—200 раз. Грамположительные бактерии родов *Bacillus*, *Staphylococcus* и *Micrococcus* оказались слабочувствительными или вообще нечувствительными к литическому действию ферментов исследованных штаммов. Устойчивыми к литическому действию термофилов были также и молочнокислые бактерии, применяемые для лечения и профилактики кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных.

Ранее отмечена интересная закономерность литического действия исследованных культур на грамотрицательные метанооксиляющие бактерии. Штаммы родов *Methylocystis* и *Methylosinus* были устойчивыми к литическим ферментам термофильных бацилл. Штаммы *Methylomonas* лизировались на 20—30 %, а лизис клеток *Methylococcus* достигал 50 % [5]. Эти результаты не являются неожиданными, так как они отражают различия в строении клеточных стенок представителей разных групп метанооксиляющих микроорганизмов.

Считаем целесообразным использовать признак устойчивости к литическим ферментам в качестве одного из удобных и быстрых вспомогательных тестов при определении родовой принадлежности метанооксиляющих бактерий.

Полученные нами данные (см. табл. 1) показали, что продуценты, обладающие высокой дрожжелитической активностью, лизируют бактерии менее интенсивно, чем продуценты с меньшим дрожжелитическим действием. Следовательно, различные штаммы термофильных бацилл синтезируют разный набор ферментов литического действия, причем эти различия могут носить как качественный, так и количественный характер.

Исследования, проведенные на протяжении нескольких лет, показали, что у всех изученных штаммов наблюдаются «сезонные» измене-

Таблица 1. Литическая активность термофильных штаммов споровых бактерий (% ΔОП<sub>540</sub>)

Продуценты	Тест-культуры									
	<i>Candida boldini</i> T2	<i>Candida</i> sp. 332	<i>Candida utilis</i> 651	<i>Rhodospiridium rubrova-tum</i> 1/48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1376	<i>Micrococcus luteus</i> 169	<i>Actinobacter calcoaceticus</i> F7	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 501	<i>Bacillus cereus</i> 90 КГУ	<i>Bacillus cereus</i> V. mycoides 444
<i>Bacillus circulans</i> 12	29	18	40	25	8	6	70	68	0	—
<i>B. subtilis</i> 13	30	24	45	37	8	9	75	69	5	—
<i>B. circulans</i> 49	40	35	51	35	7	5	60	59	5	8
<i>B. circulans</i> 51	46	30	52	30	9	6	25	58	3	—
<i>B. subtilis</i> 66	30	18	40	25	0	0	60	68	0	—
<i>B. subtilis</i> 68	44	24	48	30	8	0	61	70	13	13
<i>B. licheniformis</i> 86	37	30	40	25	21	9	70	79	9	17
<i>B. circulans</i> 90	28	15	40	23	14	0	70	75	17	27
<i>B. licheniformis</i> 94	42	23	46	27	21	0	50	62	17	19
<i>B. subtilis</i> 111	19	18	30	20	18	9	80	75	2	9
<i>B. subtilis</i> 120	30	18	23	15	19	9	66	72	10	—

Примечание. Продуценты выращивали на среде с БВК в качестве единственного источника углерода и азота.

ния уровня литической активности, которая обычно максимальна в осенне-зимний период.

При изучении особенностей биосинтеза литических ферментов термофильными споровыми бактериями нами установлено, что физиологическое состояние посевного материала оказывает существенное влияние на литическую активность всех изученных штаммов. Максимальная

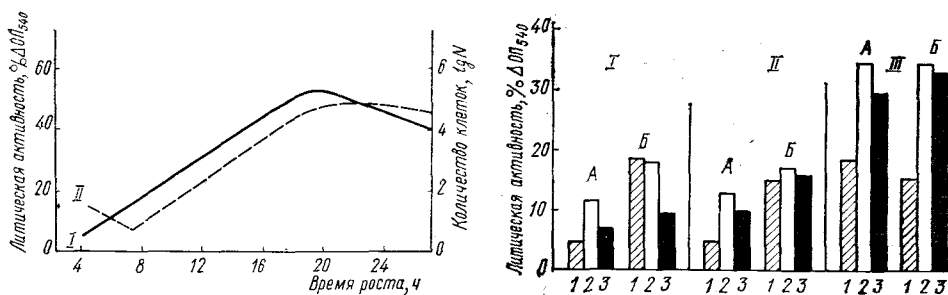


Рис. 1. Динамика роста (I) и изменение литической активности (II) штамма *V. licheniformis* 94. Культивирование проводили в колбах на качалках; тест-культура — *Acinetobacter calcoaceticus* 9.

Рис. 2. Влияние температуры культивирования на литическую активность штамма *V. licheniformis* 86. Тест-культуры: I — *Rhodospiridium diobovatum* 1/48, II — *Saccharomyces cerevisiae* 1376, III — *Candida biodinii* T2. Культивирование проводили в ферментерах (A) и на качалках (Б) при температуре 37°C (1), 45°C (2) или 50°C (3).

литическая активность наблюдалась при использовании в качестве инокулюма вегетирующих клеток 18—24-часового возраста.

Большинство штаммов синтезируют литические ферменты уже через несколько часов роста. С 8-го часа роста культуры активность ее нарастает параллельно накоплению биомассы и достигает своего пика практически одновременно с максимумом роста. В условиях выращивания на

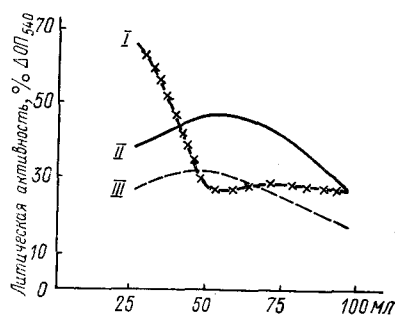


Рис. 3. Изменение литической активности штамма *V. licheniformis* 86 в зависимости от объема среды в колбах. Тест-культуры: I — *Acinetobacter calcoaceticus* 9, II — *Candida biodinii* T2, III — *Rhodospiridium diobovatum* 1/48.

качалках максимальная литическая активность отмечалась к 18—24 часам, а на ферментерах — к 16—20 часам (один из типичных опытов представлен на рис. 1).

На среде с дрожжевыми клетками штаммы росли в довольно широком диапазоне температур, но максимальный синтез литических ферментов происходил при температуре 45°C (рис. 2).

Существенное влияние аэрации на биосинтез литических ферментов выявлено как при выращивании на качалках, так и в опытах на ферментерах. Как правило дрожжелитическая активность у культур, выросших на качалках, была выше, чем у культур, выращиваемых в ферментере (см. рис. 2). Максимальная дрожжелитическая активность наблюдалась в 0,5 %-литровых колбах с 50 мл среды, тогда как максимальная бактериолитическая активность изученных термофилов — при более интенсивной аэрации (в 25 мл среды в 0,5-литровых колбах) (рис. 3).

Особенно заметное влияние на биосинтез литических ферментов оказывает состав среды. Исследование литической активности ряда термофильных споровых бактерий при культивировании на нескольких десятках органических, полусинтетических и минеральных средах пока-

зало, что интенсивный биосинтез ферментов происходит на средах, содержащих в качестве единственного источника углерода и азота клетки дрожжей или их гидролизаты (2%), а также соевую или кукурузную муку. В литературе неоднократно указывалось [1], что литические ферменты, как правило, индуцибельны. Так как литическая активность штаммов на средах с соевой или кукурузной мукой практически такая

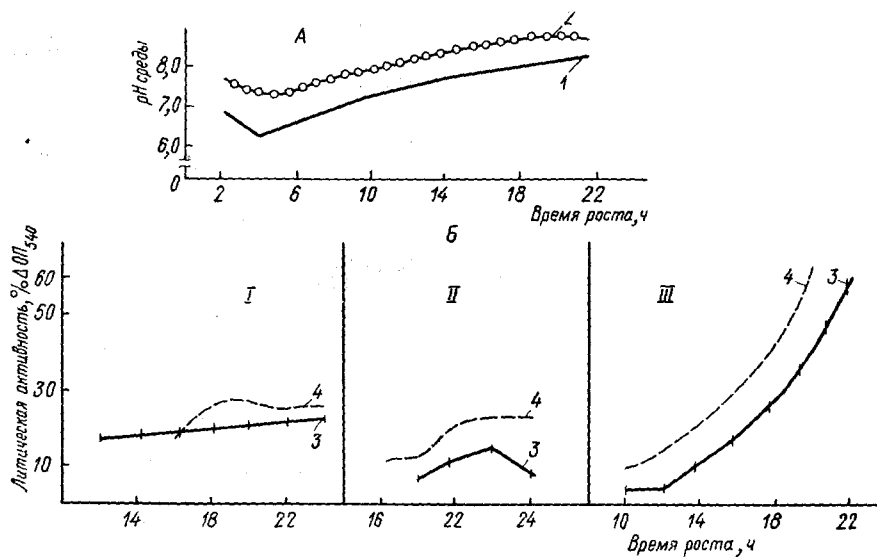


Рис. 4. Динамика изменения рН (А) и накопления литических ферментов (Б) штаммом *B. licheniformis* 86. Культивирование проводили в ферментере. 1, 2 — варианты опыта; 3 — скользящий рН среды; 4 — стабильный рН среды (рН 8,0). Тест-культуры: I — *Candida boidinii* Т2, II — *Rhodospiridium diobovatum* 1/48, III — *Acinetobacter calcoaceticus* 9.

же, как и на среде с клетками дрожжей (табл. 2), можно предположить, что все литические ферменты изученных споровых бактерий или подавляющее их большинство являются конститутивными.

Все исследованные штаммы росли в широком диапазоне рН — от 6,0 до 9,0. Максимум ферментообразования наблюдался при рН 7,0—8,0. В процессе роста культур (независимо от вида — *B. licheniformis* 86, *B. licheniformis* 94 или *B. subtilis* 111) рН среды сначала снижался, затем возрастал до 8,0 и больше. Однако синтез ими литических ферментов был более активен при стабильном рН — 8,0 (рис. 4).

Изученные нами особенности роста и ферментообразования споровых аэробных бактерий позволили разработать лабораторный регламент их культивирования, который подтвердился в полупроизводственных условиях на НПО «Фермент» (Вильнюс) при выращивании штамма *B. licheniformis* 86 в 0,25 м<sup>3</sup> ферментере с рабочим объемом 0,15 м<sup>3</sup>, перемешиванием 250 об/мин, постоянным рН (8,0) и подачей воздуха

Таблица 2. Литическая активность некоторых термофильных штаммов (% ΔOP<sub>540</sub>), выращенных на различных средах

Тест-культуры	Продуценты								
	<i>B. circulans</i> 90			<i>B. licheniformis</i> 94			<i>B. subtilis</i> 111		
	а	б	в	а	б	в	а	б	в
<i>Candida boidinii</i> Т2	47	47	40	38	31	36	37	37	42
<i>Rhodospiridium diobovatum</i> 1/48	39	27	30	40	27	28	32	32	30
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 9	33	30	34	59	51	46	60	35	50

Примечание: а — среда с пекарскими дрожжами; б — среда с соевой мукой; в — среда с кукурузной мукой.

1 объем на 1 объем среды. При этом источником углерода и азота могли служить как целые клетки дрожжей, так и их гидролизаты (табл. 3).

Итак, проведенными исследованиями установлено, что максимальный биосинтез литических ферментов всеми штаммами термофильных бактерий происходит при 45 °С в глубинной культуре на средах, содержащих в качестве источника углерода и азота дрожжевые клетки или их гидролизаты, которые могут быть заменены соевой или кукурузной мукой.

Таблица 3. Литическая активность штамма *B. licheniformis* 86 на минеральной среде с дрожжами и их гидролизатами (% ΔОП<sub>540</sub>)

Источник углерода и азота	Тест-культуры	
	<i>Candida boïdiniï</i> T2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 9
БВК	19	52
Гидролизат БВК	15	50
Пекарские дрожжи	20	60
Гидролизат пекарских дрожжей	19	64

Высокая литическая активность исследованных микроорганизмов открывает возможность использования их для наработки препаратов литических ферментов, эффективных при гидролизе дрожжевой или бактериальной биомассы с целью извлечения из нее биологически активных веществ, в том числе белков, углеводов, липидов, витаминов и др.

#### PECULIARITIES OF BIOSYNTHESIS OF LYTIC ENZYMES BY SPORE-THERMOPHILIC BACTERIA

*N. Z. Tinyanova, I. N. Pavlova, L. G. Zholner*

##### Summary

Thermophilic strains of the genus *Bacillus* bacteria synthesize extracellular enzymes lyzing an overwhelming majority of Gram-negative bacteria as well as yeast from the genera *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodospiridium*. The qualitative and quantitative composition of the lytic enzymes' complex depends on the medium composition and producers' culture conditions. The active biosynthesis of lytic enzymes by the studied strains proceeds on the media containing one of the following carbon and nitrogen sources: yeast cells, yeast hydrolyzates, soybean meal, maize meal. The maximal yeast-lytic activity of thermophilic strains is observed at a less intensive aeration than the maximal bacteriolytic one.

1. Головина И. Г. Литические ферменты микроорганизмов // Успехи микробиологии.— 1972.— № 8.— С. 108—137.
2. Захарова И. Я., Павлова И. Н. Литические ферменты микроорганизмов.— Киев: Наук. думка, 1985.— 215 с.
3. Захарова И. Я., Павлова И. Н., Коваленко Э. А. и др. Получение и характеристика литических ферментов термофильного штамма *Bacillus* sp. 86 // Микробиол. журн.— 1984.— 46, № 3.— С. 27—30.
4. Квасников Е. И., Тиньянова Н. З. Литические свойства некоторых споровых термофильных бактерий // Микробиол. журн.— 1981.— 43, № 2.— С. 152—155.
5. Романовская В. А., Будкова Е. Н., Тиньянова Н. З. Использование вспомогательных тестов для классификации метанооксиляющих бактерий // Микробиол. журн.— 1984.— 46, № 5.— С. 20—24.
6. Тиньянова Н. З., Павлова И. Н., Квасников Е. И. и др. Влияние ряда физико-химических факторов на дрожжелитическую активность термофильных бактерий рода *Bacillus* // Микробиол. журн.— 1982.— 44, № 4.— С. 14—20.

Получено 03.02.87

## ПРОТЕАЗЫ И ИХ РОЛЬ В ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТЕРМОФИЛЬНОГО ШТАММА *BACILLUS* SP. 86

Л. Г. Жолнер, И. Н. Павлова, Н. З. Тиньянова

Ин-т микробиологии и вирусологии АН УССР, Киев

Термофильный штамм *Bacillus* sp. 86 при глубинном культивировании на среде, содержащей в качестве источника углерода и азота клетки пекарских дрожжей, осуществляет биосинтез нескольких внеклеточных эндо- и экзопептидаз. Эти ферменты в комплексе гидролизуют животные и микробные белки, проявляя большее сродство к фибриллярным биополимерам, чем к глобулярным. Протеиназы также расщепляют синтетические субстраты трипсино- и химотрипсиноподобных сериновых протеиназ.

Использование ингибиторного анализа позволило получить доказательства участия экзопептидаз в литическом действии комплекса внеклеточных ферментов штамма *Bacillus* sp. 86 на клетки грамотрицательных бактерий и некоторых дрожжей.

Экзопептидазы, синтезируемые исследованным микроорганизмом, способны отщеплять свободные аминокислоты как с N-, так и с C-конца синтетических пептидов. При этом аминоксептидазная активность значительно выше карбоксипептидазной.

Ранее сообщалось, что термофильный штамм *Bacillus* sp. 86, лизирующий живые клетки бактерий родов *Pseudomonas*, *Proteus*, *Acinetobacter* и ряда других грамотрицательных бактерий, а также дрожжи родов *Candida*, *Saccharomyces* и *Rhodospiridium*, синтезирует внеклеточные протеиназы [6]. Высокая протеолитическая активность обнаружена и в препарате литических ферментов, полученном из его культуральной жидкости. В литературе встречается утверждение, что именно протеиназам принадлежит основная роль в литическом процессе [10, 13].

Настоящая работа посвящена изучению качественного состава комплекса протеолитических ферментов препарата, обладающего литическим действием, из термофильного штамма *Bacillus* sp. 86, а также установлению роли протеиназ в литическом эффекте, вызываемом препаратом при действии на живые клетки ряда микроорганизмов.

**Материал и методы.** Продукт литических ферментов *Bacillus* sp. 86 выращивали на среде, содержащей в качестве источника питания и энергии клетки прессованных пекарских дрожжей [9].

Культивирование осуществляли глубинным способом при 45 °С на качалке (220 об/мин.) в 0,5-литровых колбах, содержащих 50 мл среды.

Препарат литических ферментов получали из фильтрата культуральной жидкости продуцента (22-часовая культура) с помощью высаливания серноокислым аммонием при 80 % насыщения [2].

Все ферментативные активности препарата определяли в 50 мМ трис-НСI-буфере рН 9,1 при температуре 60 °С.

Общую протеолитическую (казеинолитическую) активность определяли по методу Ансона в модификации Петровой [7]. Проба общим объемом 5 мл содержала 2 %-й раствор казеина и 100 мкг препарата в буфере. Время реакции 10 мин. Активность выражали в единицах, соответствующих количеству микролей тирозина, освобожденного из казеина при ферментативном гидролизе в условиях опыта.

Эстеразную протеолитическую активность определяли в отношении синтетических субстратов — этилового эфира N-бензоил-L-аргинина (БАЭЭ), служащего специфическим субстратом трипсиноподобных сериновых протеиназ, и метилового эфира N-бензоил-L-тирозина (БТМЭ) — специфического субстрата химотрипсиноподобных сериновых протеиназ [4]. При этом к 2 мл раствора ферментного препарата (100 мкг) в буфере добавляли 3 мл 1 мМ раствора субстрата и определяли оптическую плотность пробы при 253 нм в нулевое время и после 10-минутной инкубации пробы. Измерение проводили против контрольной пробы, не содержавшей ферментного раствора. Активность выражали в единицах, соответствующих увеличению  $A_{253}$  на 0,01 ед в условиях опыта.

Эластазную активность препарата учитывали по изменению интенсивности поглощения при 515 нм продуктов гидролиза конго-рот-эластина [8]. Проба общим объемом 7,5 мл содержала 20 мг субстрата, 200 мкг ферментного препарата и буфер. Инкубацию проводили в течение 1 ч при постоянном встряхивании. Интенсивность развившейся окраски определяли после удаления негидролизованного эластина. Активность препарата рассчитывали по калибровочной кривой и выражали в единицах, соответствующих количеству миллиграммов расщепленного субстрата за 1 ч.

О фибринолитической активности в препарате судили по растворению фибринового сгустка [1]. Сгусток фибрина получали при смешивании 1 мл 0,9 %-го раствора фибриногена и 0,1 мл 3 %-го раствора тромбина в рабочем буфере с 0,1 М NaCl. Ре-