

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ**

Том 46, в. 3

ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК

КИЕВ — 1984

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ТЕРМОФИЛЬНОГО ШТАММА *BACILLUS* SP. 86

И. Я. Захарова, И. Н. Павлова, Э. А. Коваленко, Л. Г. Жолнер,
Е. И. Квасников, Н. З. Тиньянова, Л. П. Дрындина

Институт микробиологии и вирусологии АН УССР, Киев

Термофильная бактерия *Bacillus* sp. 86 при глубинном культивировании на среде с дрожжами образует комплекс внеклеточных литических ферментов. Препарат, полученный с помощью высаливания сернокислым аммонием (0,8 насыщения), лизирует нативные клетки представителей ряда родов и видов дрожжей и грамотрицательных бактерий с удельной активностью от 200 до 2500 ед. Активность препарата сохраняется практически без изменений не менее одного года при комнатной температуре и в холодоильнике.

Обработка препаратом микроорганизмов, чувствительных к его действию, позволяет получить в растворимом состоянии до 40—60 % внутриклеточных белков дрожжей и 60—75 % белков грамотрицательных бактерий, а также извлечь традиционными методами из клеток дрожжей в 1,4—2,7 раза больше липидов, чем из необработанных клеток.

Использование литических ферментов микробного происхождения для разрушения оболочек одноклеточных продуцентов кормового белка с целью повышения их питательной ценности, для борьбы с рядом патогенных микроорганизмов, устойчивых к традиционным лекарственным препаратам, а также для изучения структуры клеточных стенок и их компонентов у микроорганизмов представляет не только теоретический интерес, но уже сегодня находит и практическое применение.

При практическом использовании литических ферментов обнаруживается ряд их недостатков, большинство из которых присущи всем ферментным препаратам. Основной из них — небольшая продолжительность их «времени жизни», главным образом из-за тепловой денатурации.

Второй значительный недостаток литических ферментов — узкий спектр действия в отношении видов и штаммов микроорганизмов. Отсюда — необходимость поиска новых продуцентов литических ферментов различной специфичности, а также замена мезофильных продуцентов термофильными формами, продуцирующими более термостойкие ферменты [3].

Ранее нами было установлено [2], что ряд почвенных термофильных микроорганизмов из рода *Bacillus* образуют внеклеточные ферменты, лизирующие клетки дрожжей и грамотрицательных бактерий. В настоящей работе мы сообщаем о получении препарата литических ферментов одного из этих продуцентов.

Материал и методы. Продуцент *Bacillus* sp. 86 выращивали на среде следующего состава (в г/л): клетки сухих пекарских дрожжей — 20; KH_2PO_4 —2,0; MgSO_4 —1,0. В одном из опытов вместо пекарских дрожжей в среду вносили кормовые дрожжи (БВК) в том же количестве.

Выращивание проводили в полулитровых колбах с 50 мл среды на качалке (180 об/мин) при 45 °С в течение 22—24 ч. Клетки осаждали центрифугированием и культуральную жидкость использовали для получения препаратов литических ферментов с помощью осаждения либо сернокислым аммонием, 80 % насыщения (препарат 1), либо изопропиловым спиртом, 60 об. % (препарат 2).

Полученные осадки растворяли в воде, диализовали против воды и лиофилизировали. Препараты литических ферментов хранили в холодильнике при 6 °С.

Литическую активность определяли по снижению оптической плотности при 540 нм в пробе общим объемом 2 мл, содержащей взвесь клеток тест-культуры в 0,05 М трис-НСI-буфере pH 9,1 и ферментный материал (100—200 мкг белка). Начальная плотность пробы обычно составляла 0,5—0,6. Время реакции — 30 мин, температура — 60 °С. Активность выражали либо в процентах снижения плотности (после вычета контроля), либо в единицах, рассчитанных по формуле:

$$E = \frac{\Delta \text{ОП}_{540} \cdot b}{a},$$

где E — число единиц, $\Delta \text{ОП}_{540}$ — снижение оптической плотности при 540 нм за 30 мин, а — содержание белка в пробе, мг; б — объем пробы, мл.

При определении дрожжелитической активности в качестве тест-объекта использовали клетки 18-часовой культуры *Candida boidinii* T2, выращенной на сусло-агаре; при определении бактериологической активности — клетки 28-часовой культуры *Acinetobacter calcoaceticus* 57, выращенной на агаризованной среде с этиловым спиртом [1].

Спектр действия препарата определяли в отношении интактных клеток представителей некоторых родов и видов дрожжей и грамотрицательных бактерий.

Токсичность препарата литических ферментов проверяли на белых мышах. Пяти группам животных весом по 20 г (5 штук в каждой) вводили внутривенно растворенный в физиологическом растворе препарат в количестве 50, 100, 150, 200 и 250 мг на 1 кг веса животных соответственно. Контрольной группе мышей вводили по 0,5 мл физиологического раствора. Состояние животных наблюдали в течение двух недель, затем их убивали и исследовали внутренние органы.

Общие углеводы определяли по реакции с фенолом и серной кислотой [4]; белок — по методу Лоури [5]. Липиды извлекали из клеток дрожжей трехкратной экстракцией по 1,5 ч смесью метиловый спирт — хлороформ (1:2).

Результаты и их обсуждение. Сравнение выхода и активности препаратов 1 и 2, полученных из 100 мл фильтрата культуральной жидкости, показало (табл. 1), что при выделении комплексного препарата литических ферментов *Bacillus* sp. 86 осаждение серноокислым аммонием предпочтительнее. Удельная активность полученных препаратов была практически одинаковой, но суммарная активность препарата 1 в 8 раз выше. Поэтому в дальнейшем комплексный препарат получали путем высаливания фильтрата культуральной жидкости продуцента серноокислым аммонием (561 г/л).

Таблица 1. Характеристика исследуемых препаратов литических ферментов*

Препарат	Вес, мг (на 100 мл фильтрата)	Белок, мг		Активность, ед.			Удельная активность
		на 1 мг препарата	всего	на 1 мг препарата	всего	%, от исходной	
Препарат 1 (осаждение (NH ₄) ₂ SO ₄)	108,0	0,65	70,20	245	26460	63,9	376,9
Препарат 2 (осаждение изопропиловым спиртом)	46,8	0,185	8,66	72	3370	8,1	389,2

* Активность определяли в отношении живых клеток *C boidinii*.

Таблица 2. Активность препаратов литических ферментов (в ед/мг белка) в отношении различных микроорганизмов

Тест-культура	Источник углерода и азота в среде	
	БВК	Прессованные пекар- ские дрожжи
<i>Candida utilis</i> 651	0	187,5
<i>Candida</i> sp. 332	57,0	218,7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1375	71,4	406,2
<i>Rhodospiridium diabolatum</i> 1/48	214,2	937,5
<i>Micrococcus luteus</i> 169	142,8	218,8
<i>Pseudomonas</i> sp. 187	—	1000,0
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 57	571,0	2187,3
<i>Proteus vulgaris</i> 234	1014,0	2531,0

Примечание. Приведены средние из трех опытов. «—» — не исследовали.

Лиофилизированный препарат литических ферментов имел слегка коричневый цвет и практически полностью растворялся в воде. Он содержал 60—75 % белка и 10—15 % углеводов.

Комплексный ферментный препарат активно лизировал живые клетки грамотрицательных бактерий родов *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus* и дрожжей родов *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodospiridium*. Активность в отношении грамположительных бактерий была значительно ниже (табл. 2).

Следует отметить, что препарат, полученный при культивировании продуцента на среде с пекарскими дрожжами, оказался более активным, чем препарат из культуральной жидкости *Bacillus* sp. 86 после роста на среде, содержащей БВК.

Таблица 3. Влияние сроков хранения препарата литических ферментов при различных температурах на его активность

Год и месяц исследования	Активность*					
	дрожжелитическая			бактериолитическая		
	22 °С	6 °С	-8 °С	22 °С	6 °С	-8 °С
Первый год						
I	460	460	460	740	740	740
XII	450	470	447	714	730	731
Второй год						
I	433	440	—	700	712	710
II	420	417	420	680	690	670
IV	411	402	416	620	617	624
VI	367	367	333	535	566	550
VII	308	283	342	475	467	475
IX	—	250	—	—	333	—
XI	—	258	—	—	330	—
XII	—	250	—	—	325	—

Примечание. * Представлена удельная активность в единицах; «—»—исследования не проводили.

При действии препарата на прогретые (100 °С, 15 мин) клетки тест-культур литический эффект был значительно сильнее. Так, 30-минутная обработка прогретых клеток *Candida boidinii* препаратом в разведении 1:20000 снижала оптическую плотность суспензии на 75—80 %, а в раствор переходило 40—60 % белка взятых в опыт клеток. С прогретыми клетками *A. calcoaceticus* такой же литический эффект достигался за 10 мин, а растворимый белок в пробе составлял 60—75 % от содержавшегося в клетках. Эффективность препарата в отношении интактных клеток этих же микроорганизмов была ниже на 30—40 %.

Обработка литическими ферментами *Bacillus* sp. 86 клеток микроорганизмов способствовала выходу и других компонентов: инкубирование прогретых клеток *Rhodotorula rubra* с препаратом (2,5 % к сухому весу клеток) в течение 30 мин позволяло выделить из них традиционным методом в 1,4—2,7 раза больше липидов, чем без такой обработки.

Для препаратов, рекомендуемых к практическому применению, важной является их стабильность при длительном хранении. Поэтому нами было исследовано изменение дрожжелитической и бактериолитической активности препарата во времени при различных температурных режимах. Образцы препарата, хранившиеся при комнатной температуре (около 22 °С), в холодильнике (6 °С) и в морозильной камере (-8 °С), исследовали в течение двух лет с интервалами 1—2 мес. Представленные данные (табл. 3) свидетельствуют о том, что в течение года активность препарата оставалась практически без изменений; на втором году хранения началось снижение как дрожжелитической, так и бактериологической активности, причем последняя снижалась несколько быстрее. Изменение активности происходило одинаково при всех исследованных температурах. Следовательно, хранение препарата не требует особых предосторожностей и пониженных температур.

Для препаратов, которые могут быть рекомендованы к практическому использованию, обязательной является проверка токсичности. Исследование препарата литических ферментов показало, что он не ток-

сичен для белых мышей при внутрибрюшинном введении в концентрации до 250 мг на 1 кг веса. У животных не наблюдалось летального исхода, они не болели, их внутренние органы при макроскопическом исследовании оказались в норме.

Таким образом, литические ферменты, биосинтез которых осуществляется термофильной бактерией *Bacillus* sp. 86 при глубинном культивировании на среде с дрожжевыми клетками, активно лизируют клетки некоторых видов дрожжей и грамотрицательных бактерий, сохраняя свою активность в течение не менее одного года.

PRODUCTION AND CHARACTERISTIC OF METHODIC ENZYMES OF THERMOPHILIC STRAIN *BACILLUS* SP. 86

I. Ya. Zakharova, I. N. Pavlova, E. A. Kovalenko, L. G. Zholner,
E. I. Kvasnikov, N. Z. Tinyanova, L. P. Dryndina

Summary

Thermophilic bacterium *Bacillus* sp. 86 under submerged cultivation in the medium with yeast produces a complex of extracellular lytic enzymes. The preparation obtained by ammonium sulphate (0.8 saturation) salting-out lyses native cells of representatives of some genera and species of yeast and Gram-negative bacteria with the specific activity of 200-2500 units. The preparation activity is practically without changes not less than a year at the room temperature and in a refrigerator. The preparation treatment of microorganisms sensitive to the preparation action permits obtaining to 40-60 % of soluble intracellular proteins of yeast and 60-75 % of soluble proteins of Gram-negative bacteria and permits extracting 1.4-2.7 higher amount of lipids from yeast cells (as compared with untreated cells) by conventional methods.

1. Степанюк В. В., Квасников Е. И., Гавриленко М. Н., Сумневич В. Г. Структурные особенности клеток *Acinetobacter calcoaceticus* К-9, усваивающих этанол при различных скоростях разбавления среды.— Микробиол. журн., 1979, 41, № 5, с. 456—465.
2. 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.
3. Cowan D. A., Daniel R. M. Purification and some properties of an extracellular protease (caldolysin) from an extreme thermophile.— Biochim. et biophys. acta., 1982, 705, N 2, p. 293—305.
4. Dubois M., Gilles K., Hamilton J. K. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances.— Anal. Chem., 1956, 28, N 1, p. 350.
5. Lowry O. H., Rosebrough H. J., Farr A. L., Randall R. G. Protein measurement with the Folin reagent.— J. Biol. Chem., 1951, 193, N 1, p. 265—275.

Получено 16.09.83

УДК 579.841.11.22

РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА МЕТАПИРОКАТЕХАЗЫ 1 И МЕТАПИРОКАТЕХАЗЫ 2 У *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* 2x

И. А. Катаева, Л. А. Головлева

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, Пущино

Субстратная специфичность метапирокатехазы у *Pseudomonas aeruginosa* 2x изменяется в зависимости от структуры индуктора и конечного продукта окисления ароматических соединений. Показано, что эти изменения обусловлены различиями между метапирокатехазой 1 и метапирокатехазой 2 по специфичности индукции и чувствительности к репрессирующим воздействиям. Обсуждается физиологический смысл существования у культуры двух изоферментов метапирокатехазы.

Культура *Pseudomonas aeruginosa* 2x, окисляющая ряд ароматических соединений, способна синтезировать четыре фермента расщепления ароматического кольца: пирокатехазу, протокатехат-3,4-диоксигеназу и два изофермента метапирокатехазы — метапирокатехазу 1 (МПК1) и метапирокатехазу 2 (МПК2) [1—4].