

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

ПРИКЛАДНАЯ
БИОХИМИЯ
И МИКРОБИОЛОГИЯ

Том XXI

(ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК)

5

МОСКВА · 1985

УДК 576.851.51.095

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕПАРАТА ЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
*BACILLUS SP. 86*****ПАВЛОВА И. Н., ЖОЛНЕР Л. Г.**

Получен препарат внеклеточных ферментов термофильного штамма *Bacillus sp. 86*, проявляющий бактерио- и дрожжелитическое действие. Установлено, что в препарате содержится не менее двух бактериолитических ферментов. Один из них выделен в электрофоретически гомогенном состоянии. Часть бактериологической активности препарата не отделялась от дрожжелитической и протеолитической активностей на всех этапах очистки методом ионообменной хроматографии. Предполагается, что литическое действие этих компонентов препарата обуславливается протеазами (протеазой).

Многие представители рода *Bacillus* синтезируют ферменты, проявляющие способность лизировать клеточные стенки микроорганизмов [1—5]. Внеклеточные литические ферменты бацилл обладают различной специфичностью в отношении характера гидролизуемой связи в полимерах клеточной стенки и различаются по спектру микроорганизмов, доступных их действию. Поэтому поиск новых продуцентов литических ферментов, позволяющих расширить набор эффективных препаратов для разрушения клеточных стенок микроорганизмов, перспективных в качестве источника микробного белка или физиологически активных веществ, а также для борьбы с патогенными формами, остается актуальным и сейчас.

Ранее было установлено [6], что некоторые штаммы термофильных споровых бактерий эффективно лизируют стенки ряда видов дрожжей и грамотрицательных бактерий. Настоящая работа посвящена выделению литических ферментов *Bacillus sp. 86* и очистке одного из них.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**Методика**

Продуцент литических ферментов *Bacillus sp. 86* выращивали на среде следующего состава (г/л): клетки сухих пекарских дрожжей — 20; KH_2PO_4 — 2,0; MgSO_4 — 1,0. Культивирование осуществляли на качалке (180 об/мин) при 45° в течение 22—24 ч в колбах объемом 0,5 л, содержащих 50 мл среды. Активный материал выделяли из фильтрата культуральной жидкости с помощью серноокислого аммония (0,8 насыщения).

В качестве тест-организмов использовали клетки 18-часовой культуры *Candida boidinii* T2, выращенной на сусло-агаре (при определении дрожжелитической активности), и клетки грамотрицательного палочковидного микроорганизма *Acinetobacter calcoaceticus*, росшего на среде с этиловым спиртом [7] в течение 22—24 ч (при определении бактериолитической активности).

Литическую активность определяли по снижению оптической плотности суспензии клеток тест-культуры при 540 нм. Проба общим объемом 2 мл, содержащая взвесь клеток с исходной плотностью 0,8—1,0 в 0,05 М трис-НСI-буфере (1 мл), ферментный материал (100—200 мкг белка) и тот же буфер (до 2 мл), инкубировалась при 60° в ультратермостате УТ-15 в течение 30 мин.

После вычета величины снижения A_{540} в контрольных пробах из соответствующих величин для опытных проб активность рассчитывали по

формуле:

$$E = \frac{\Delta A_{540} \cdot a}{b},$$

где E — количество единиц, ΔA_{540} — изменение оптической плотности пробы, a — объем пробы, мл; b — количество белка в пробе, мг.

В некоторых случаях активность выражали в процентах снижения оптической плотности пробы, рассчитанных по формуле:

$$B = \frac{A_{540} - A'_{540}}{A_{540}} \cdot 100,$$

где B — число процентов, A_{540} — оптическая плотность пробы до инкубации; A'_{540} — оптическая плотность пробы после инкубации.

Активность карбогидраз определяли по увеличению количества редуцирующих веществ в пробе, содержащей 500 мкг субстрата и исследуемый материал (100—200 мкг белка) в 0,05 М трис-НСI-буфере, рН 9,1 (объем пробы 2 мл). Время реакции 1 ч, температура 60°. Активность выражали в единицах, соответствующих количеству мкмоль-эквивалентов глюкозы в пробе.

Субстратами служили: β -глюканы (глюкан ячменя, внеклеточный глюкан *Aureobasidium pullulans* [8] и КМ — целлюлоза), α -глюканы (декстран, растворимый крахмал, амилопектин, амилоза), дрожжевые α -маннаны (из *Saccharomyces cerevisiae* и *Cryptococcus laurentii*), β -маннан *Rhodotorula rubra*, растительные глюко- и галактоманнаны, хитин панциря краба.

Редуцирующие вещества определяли по методу Нельсона — Шомоди [9].

Протеолитическая активность учитывалась по методу Ансена в модификации Петровой [10] и выражалась в единицах, соответствующих количеству мкмоль тирозина, освобожденного за 10 мин в пробе объемом 5 мл и содержащей 2 мл 2%-ного раствора казеина, ферментный материал и 0,05 М трис-НСI-буфер, рН 9,1.

Гель-фильтрацию проводили на колонке с сефадексом G-100 (Pharmacia Fine Chemicals) размером 2×21 см. Ионообменную хроматографию осуществляли на ДЭАЭ-целлюлозе («Реанал», Венгрия) емкостью 0,75 г/экв (колонка размером 1,5×23 см) и анионообменном полимере Моно-Q (Pharmacia Fine Chemicals) размер колонки 1,5×5 см. Скорость элюирования составляла 20, 30, 60 мл/ч с колонок сефадекса G-100, ДЭАЭ-целлюлозы и Моно-Q соответственно.

Электрофорез в ПААГе проводили в трис-глициновом буфере, рН 9,3 при силе тока 5 мА на трубочку. Белок в столбиках геля красили амидочерным.

Белок определяли по методу Лоури [11].

Пептидогликан получали из клеток *Acinetobacter calcoaceticus*, обработанных 4%-ным раствором додецилсульфата натрия [12] и трипсином. Чистоту полученного полимера проверяли, анализируя его кислотный гидролизат (4н. НСI, 16 ч) на аминокислотном анализаторе.

Результаты и их обсуждение

Неочищенный препарат ферментов литического действия получали при осаждении белков фильтрата культуральной жидкости *Bacillus sp.* 86 сернокислым аммонием (561 г/л). Образовавшийся осадок растворяли в воде и диализовали против нее же до полного удаления соли из раствора. Высушенный лиофильно материал содержал до 70% белка и проявлял как бактериолитическое действие (2190 ед/мг белка), так и дрожжелитическую активность (370 ед/мг белка). По данным электрофореза в ПААГе в препарате литических ферментов содержалось не менее 11 белковых компонентов (рис. 1).

С целью установления природы ферментов, содержащихся в препарате и обуславливающих литическое действие, определяли его актив-

ность в отношении ряда субстратов, представляющих собой компоненты клеточных стенок микроорганизмов или соединения, близкие им по структуре (полимеры глюкозы, маннозы и N-ацетилглюкозамина). При этом было обнаружено, что неочищенный препарат литических ферментов проявляет протеолитическую (3,6 ед), амило-1,6-глюкозидазную (4,2 ед.) и незначительную (менее 1 ед.) эндо-1,3 (4)- β -глюканазную активность (представлены количественные характеристики в пересчете на 1 мг белка). Он гидролизует пептидогликан *Acinetobacter calcoaceticus* и не гидролизует дрожжевые маннаны, а также остальные исследованные субстраты (см. Экспериментальную часть).

Разделение компонентов ферментного препарата проводили методом колоночной хроматографии. Первый этап разделения представлял собой гель-фильтрацию на сефадексе G-100.

На колонку размером 2,0×21 см наносили 20 мг препарата, растворенного в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 9,1, и элюировали этим же буфером со скоростью 20 мл/ч. Во фракциях объемом 3 мл определяли белок по оптической плотности при 280 нм (A_{280}), дрожже- и бактериолитическую активности, а также протеолитическую и амило-1,6-глюкозидазную (как основные, обнаруженные в препарате). Профиль элюции и распределение активностей, представленные на рис. 2, показывают, что дрожже-, бактерио- и протеолитическая активности не разделялись на сефадексе G-100. Амило-1,6-глюкозидаза элюировалась практически вся с белковым материалом, в котором обнаруживалась лишь слабая литическая активность.

Фракции, содержавшие основную часть литической активности (с 13 по 45 мл на рис. 2), объединяли, концентрировали на роторном испарителе, диализовали против 0,05 М трис-HCl-буфера, pH 7,5 и хроматографировали на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (1,5×23 см), уравновешенной тем же буфером (2-й этап очистки). При этом часть белкового материала не сорбировалась на ионообменнике из стартового буфера при скорости элюции 30 мл/ч (пик I на рис. 3). Белок, связавшийся в этих условиях с ДЭАЭ-целлюлозой, элюировали в градиенте концентрации NaCl (0—1 М). Основная масса связавшегося белка элюировалась 0,1—0,4 М раствором NaCl (пик II на рис. 3).

Анализ ферментативных активностей в элюате показал, что в первом пике, называемом далее фракцией ДЭАЭ-1, находилась практически вся нанесенная на колонку дрожжелитическая и протеолитическая активности и ок. 40% бактериолитической (табл. 1). Во втором пике (фракция ДЭАЭ-2) обнаруживалась только бактериолитическая активность.

По данным электрофореза в ПААГе, обе фракции были гетерогенными и содержали 5 (ДЭАЭ-1) и 6 (ДЭАЭ-2) белковых компонентов. Их разделение на индивидуальные белки было осуществлено методом скоростной жидкостной хроматографии на анионообменнике Моно-Q (3-й этап очистки).

На колонку размером 1,5×5 см, уравновешенную 0,05 М трис-HCl-буфером, pH 8,8, наносили без предварительной концентрации и диализа материал фракции ДЭАЭ-1 или ДЭАЭ-2 и элюировали со скоростью 1 мл/мин в градиенте NaCl (0—0,5; 0,5—1,0 М), создаваемом в старто-

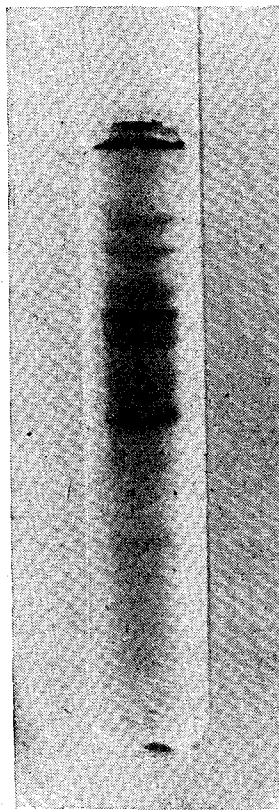


Рис. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле неочищенного препарата литических ферментов *Bacillus sp.* 86

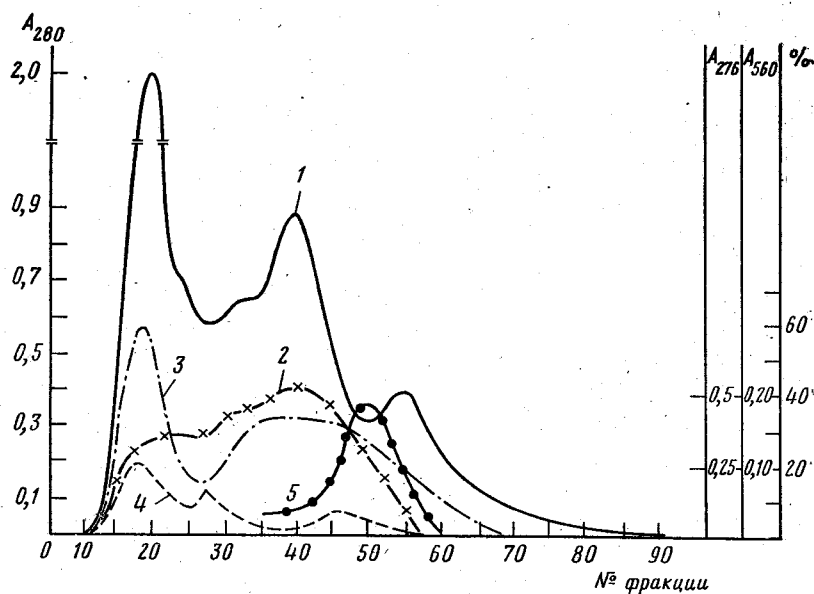


Рис. 2. Гель-фильтрация неочищенного препарата литических ферментов на сефадексе G-100.

1 — белок, A_{280} ; 2 — дрожжелитическая активность, % лизиса; 3 — бактериолитическая активность, % лизиса; 4 — протеолитическая активность, A_{276} ; 5 — амило-1,6-глюкозидазная активность, A_{560} ; 6 — градиент концентрации NaCl, M

вом буфере. В этих условиях часть белка фракции ДЭАЭ-1, проявлявшего литическую и протеолитическую активности, не сорбировалась на Моно-Q (пик 1 на рис. 4). Белковый материал, элюирующийся с колонки в градиенте NaCl, разделился на пять компонентов (пики 2—6 на рис. 4). Фракции, соответствующие определенным пикам в ряде аналогичных элюатов, объединяли, обессоливали на сефадексе G-25, концентрировали на роторном испарителе и определяли в них литическую и протеолитическую активности. Оказалось, что ферменты, содержащиеся в пиках 2 и 3, лизировали клетки *Candida boidinii* и *Acinetobacter calcoaceticus*, а также гидролизovali казеин. Отдельным пиком (4 на рис. 4) с Моно-Q элюировалась протеаза, не проявляющая литических свойств.

Связь литической и протеолитической активностей в пиках 1—3 (рис. 4) не исключает возможности, что именно протеаза (или протеазы) обуславливает как дрожже-, так и бактериолитическое действие фракции ДЭАЭ-1. Наличие компонента с протеолитической, но без литической активности указывает на способность *Bacillus sp.* 86 синтезировать несколько протеаз с различными свойствами.

При хроматографии на Моно-Q фракция ДЭАЭ-2 разделилась на шесть белковых компонентов (рис. 5). Хотя полного отделения белков

Разделение компонентов комплекса

Препарат	Объем, мл	Белок			Дрожжелитическая активность			
		мг/мл	всего		ед./мл	всего		удельная, ед./мг
			мг	%		ед.	%	
Исходный	3	4,7	14,1	100	2491	7473	100	530,0
Элюат G-100	25	0,39	9,9	70,2	251,6	6290	84,2	635,3
ДЭАЭ-1	2	0,114	2,85	20,2	209,6	5240	70,1	1839,6
ДЭАЭ-2	40	0,105	4,2	30,0	4,75	189	2,5	—

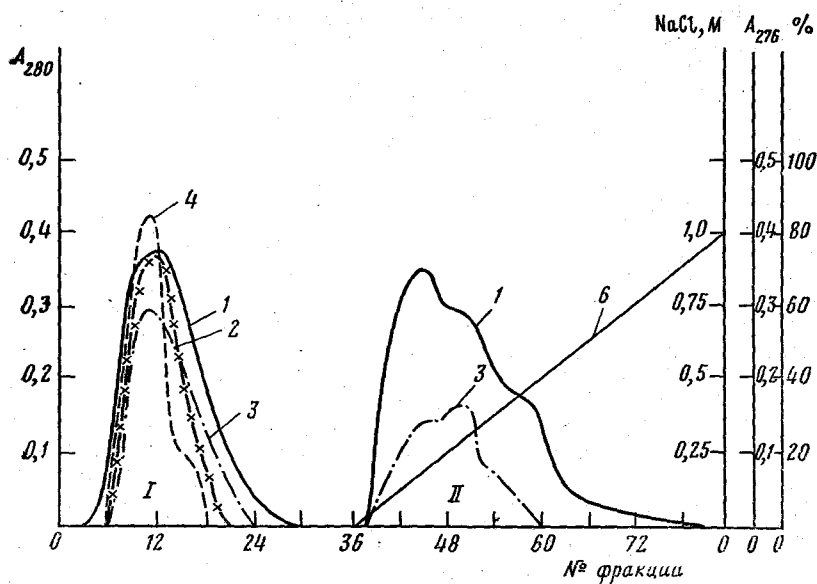


Рис. 3. Хроматография препарата литических ферментов на ДЭАЭ-целлюлозе (обозначения — см. рис. 2).

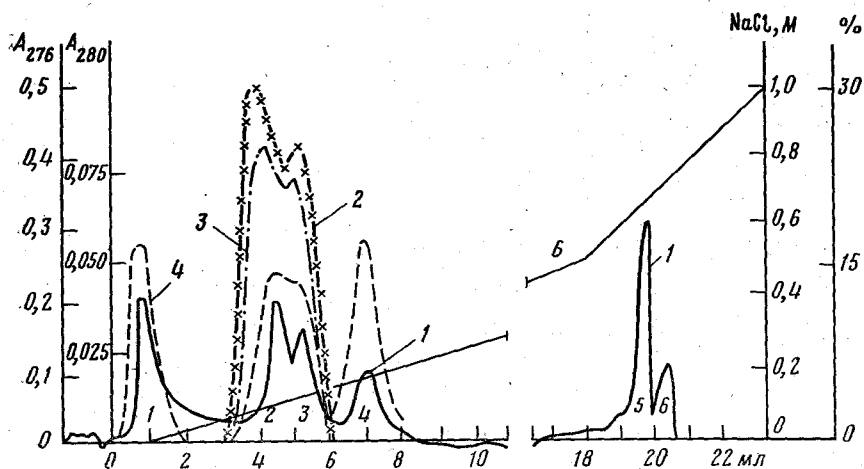


Рис. 4. Хроматография фракции ДЭАЭ-1 на анионообменнике Моно-Q (обозначения — см. рис. 2)

друг от друга при этом достигнуто не было, все же практически вся литическая активность была связана с пиком, элюировавшимся 0,3 М NaCl.

Отдиализованный от солей и сконцентрированный материал пика 4, (фракции 12—13 из нескольких типичных элюатов), именуемый далее

Таблица 1

литических ферментов *Bacillus sp.* 86

ед./мл	Бактериолитическая активность			Протеолитическая активность			
	всего		удельная, ед./мг	ед./мл	всего		Б удел./ная, ед.·мг
	ед.	%			ед.	%	
4089,0	12 267	100	870	7,2	21,6	100	1,45
372,5	9 317	76,0	941,1	0,75	18,75	86,8	1,92
152,8	3 820	31,1	1340,5	0,7	17,5	81,0	6,1
126,4	5 056	41,2	1203,8	0,0115	0,46	2,1	—

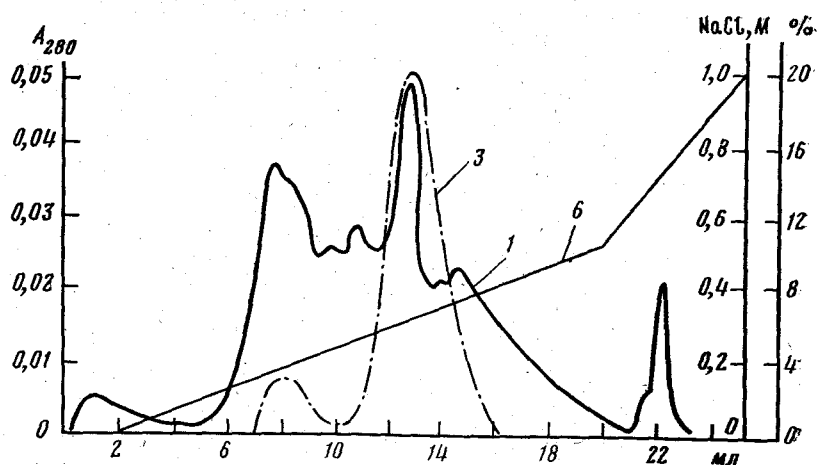


Рис. 5

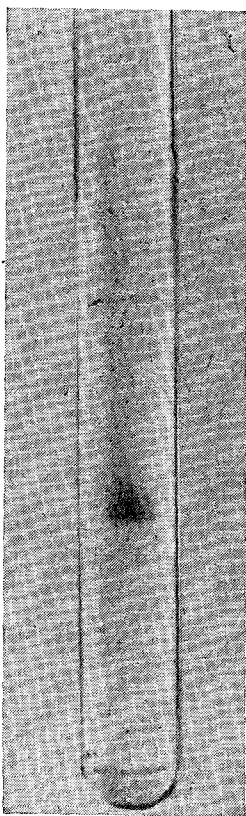


Рис. 5. Хроматография фракции ДЭАЭ-2 на анионообменнике Мо-по-Q (обозначения — см. рис. 2)

Рис. 6. Электрофорез в полиакриламидном геле фракции ДЭАЭ-2-4

Рис. 6

фракцией ДЭАЭ-2-4, при электрофорезе в ПААГе мигрировал в виде одной полосы (рис. 6) с R_f 0,45 по отношению к бромфеноловому синему. Электрофоретически гомогенный бактериолитический фермент лизировал нативные клетки *A. calcoaceticus* с активностью 8420 ед/мг белка в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 9,1 при температуре 60° в присутствии NaCl. Оптимальной оказалась концентрация этой соли $2-3 \times 10^{-1}$ М (табл. 2).

Вместе с тем было установлено, что присутствие NaCl в пробе приводило к угнетению бактериолитической активности фракции ДЭАЭ-1. При концентрации NaCl, равной 0,3 М, т. е. такой, как в растворе, элюирующем фракцию ДЭАЭ-2-4 и обеспечивающем ее максимальную активность, бактериолитическое действие фракции ДЭАЭ-1 снижалось

двое (табл. 2). Эти данные позволяют заключить, что способность фракции ДЭАЭ-1 лизировать клетки *A. calcoaceticus* не обуславливается примесью бактериолитического фермента, полученного в электрофоретически гомогенном состоянии.

Таким образом, проведенное исследование показало, что термофильная бактерия *Bacillus sp.* 86 синтезирует одновременно несколько внеклеточных литических ферментов. Способность образовывать одновре-

Таблица 2

Влияние NaCl на активность ферментов бактериолитического действия *Bacillus sp.* 86

Объект исследования	Активность, % от максимальной					
	без NaCl	с NaCl, М				
		0,05	0,1	0,2	0,3	0,5
ДЭАЭ-2-4	4,6	42,0	90,6	100,0	100,0	98,4
ДЭАЭ-1	100,0	97,2	—	—	52,4	11,3

Примечание. В таблице представлены средние данные из трех опытов.

менно два-три высокоактивных литических фермента различной природы обнаружена у стафилококков [13] и актиномицетов [14, 15]. Это наше сообщение описывает такое же явление у представителя рода *Bacillus*, выделяющего в среду одновременно ферменты как дрожже-, так и бактериолитического действия. Последнее проявляют не менее двух ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Richmond M. H. Formation of a lytic enzyme by a strain of *Bacillus subtilis*.— Biochem. Biophys. Acta, 1959, v. 33, p. 78—92.
2. Okada S., Kitahata S. Purification and some properties of bacterial lysozyme.— J. Ferment. Technol., 1973, v. 51, p. 705—712.
3. Takahara Y., Machigaki E., Murao S. General properties of endo-N-acetylmuramidase of *Bacillus subtilis* YT-25.— Agric. Biol. Chem., 1974, v. 38, p. 2357—2365.
4. Tsujisaka Y., Tominaga Y., Iwai M. Purification and some properties of the lytic enzyme from *Bacillus R-4* which acts on *Rhizopus* cell wall.— Agric. Biol. Chem., 1975, v. 39, p. 145—152.
5. Боровикова В. П., Аксеновская В. Е., Лавренова Г. И., Кислухина О. В., Калунянец К. А., Степанов В. М. Выделение и характеристика литического фермента из *Bacillus subtilis* 797.— Биохимия, 1980, т. 45, с. 1524—1533.
6. Квасников Е. И., Тиньянова Н. З. Литические свойства некоторых споровых термофильных бактерий.— Микробиол. журн., 1981, т. 43, с. 152—155.
7. Квасников Е. И., Гавриленко М. М., Павленко М. И., Сумневич В. Г., Соломко Е. Ф., Руда С. П. Деякі особливості росту *Acinetobacter anitratum*, штам К-9, на середовищах з етанолом.— Микробиол. журн., 1976, т. 38, с. 683—686.
8. Елинов Н. П., Матвеева А. К. Внеклеточный глюкан, продуцируемый *Aureobasidium pullulans*.— Биохимия, 1972, т. 37, с. 255—257.
9. Somogyi M. Notes on sugar determination.— J. Biol. Chem., 1952, v. 195, p. 19—23.
10. Петрова И. С., Винцонойге М. М. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробиологического происхождения.— Прикл. биохим. и микробиол., 1966, т. 2, с. 322—327.
11. Lowry H., Rosebrough N. J., Farr A. Z., Randall R. G. Protein measurement with the Folin reagent.— J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
12. Yanai A., Kato K., Beppu T., Arima K. Peptidoglycan of *Pseudomonas aeruginosa*.— Agric. Biol. Chem., 1976, v. 40, p. 1505—1508.
13. Wadström T., Vesterberg O. Studies on endo- β -N-acetylglucosaminidase, staphylolytic peptidase and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase in lysostaphin and from *Staphylococcus aureus*.— Acta pathol. Microbiol. Scand., 1971, B. 79, p. 248—264.
14. Yoshimoto T., Tsuru D. Studies on bacteriolytic enzymes. II. Purification and some properties of two types of staphylolytic enzymes from *Streptomyces griseus*.— J. Biochem., 1972, v. 72, p. 379—390.
15. Aksnes L., Grov A. Studies on the bacteriolytic activity of *Streptomyces albus* culture filtrates. I. The effect of variations in cultivation conditions and the screening of various enzyme specificities.— Acta chem. Scand., 1974, B. 28, p. 185—192.

**INVESTIGATION OF A PREPARATION OF THE LYTIC ENZYMES
OF *BACILLUS SP. 86***

PAVLOVA I. N., ZHOLNER L. G.

*Institute of Microbiology and Virology, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR,
Kiev*

A preparation of the extracellular enzymes of the thermophilic strain *Bacillus sp. 86* was obtained that demonstrated bacterio- and yeastlytic activities. It was found that the preparation contained at least two bacteriolytic enzymes. One of them was extracted in the electrophoretically homogeneous state. A part of the bacteriolytic activity of the preparation did not separate from the yeastlytic and proteolytic activities on all the steps of purification by ion-exchange chromatography. The lytic activity of the preparation seems to be related to the action of proteases (protease).