

УДК 576.851.51.098

БАКТЕРИИ РОДА *BACILLUS* – АКТИВНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Л. А. Сафронова, А. И. Осадчая, В. М. Иляш, Е. В. Мишак

Бактерии рода *Bacillus* – активные продуценты гидролитических ферментов. — Л. А. Сафронова, А. И. Осадчая, В. М. Иляш, Е. В. Мишак. — Проведен скрининг 226 штаммов бактерий рода *Bacillus*, относящихся к 13 видам, способных к деструкции различных субстратов. Показано, что свойство штаммов гидролизовать как углеводные, так и белковые субстраты, широко распространено среди представителей рода *Bacillus*, выделенных из различных эконичи. Наибольшее количество продуцентов выявлено у штаммов, изолированных из лечебных грязей озер Украины и Литвы. Штаммы бактерий вида *Bacillus subtilis* доминировали среди исследованных бацилл, как по численности, так по степени и спектру ферментативной активности. Установлено, что 5 штаммов из числа изученных не гидролизуют крахмал и 106 штаммов не расщепляли белковый субстрат эластин.

Получены штаммы бацилл с широкой субстратной специфичностью – перспективные для создания ферментных препаратов, применяемых в разных отраслях промышленности, ветеринарии и медицины.

Ключевые слова: род *Bacillus*, гидролитические ферменты, субстратная специфичность, степень активности.

Адрес: Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина, e-mail: safronova_larisa@ukr.net

Bacteria of *Bacillus* genus – active producers hydrolytic enzymes. — L. A. Safronova, A. I. Osadchaya, V. M. Ilyash, E. V. Mishak. — Screening 226 strains the bacteria of *Bacillus* genus belonging to 13 species, capable to degradation various substrates were carried out. It was shown that property of strains to hydrolyze both carbohydrate, and albumen substrates is widely distributed among the representatives of *Bacillus* genus isolated from various econiches. The greatest quantity of producers were found at strains isolated from therapeutic muds of lakes of Ukraine and Lithuania. Strains of bacteria of species *Bacillus subtilis* dominated among investigated bacilli, both by the number and the degree and a spectrum fermentative activity. It was established that 5 strains from among investigated practically did not hydrolyze starch and 106 strains did not split an albumen substratum elastin. The strains of bacilli with wide substrate specificity – prospective for the development of the enzyme preparations, used in different industries, veterinary science and medicine have been obtained.

Key words: *Bacillus* genus, hydrolytic enzymes, substrate specificity, degree of activity

Address: Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Zabolotny Str.154, Kyiv D-0368, CSP, Ukraine; e-mail: safronova_larisa@ukr.net

Вступлення

Бактерии рода *Bacillus* обладают разносторонней полиферментной активностью. Их энзимные системы включают набор ферментов различных классов, что обеспечивает им возможность существовать на разнообразных субстратах. У бацилл особенно развита система гидролаз (17). Эти микроорганизмы синтезируют хитиназы, α -амилазы, протеазы, лактамазы, целлюлазы и ряд других ферментов (3, 9, 16, 19, 22).

Особое внимание исследователи уделяют изучению ферментов, представляющих интерес для внедрения в современные промышленные технологии, в медицинскую и ветеринарную практику (6). В литературе имеются сообщения об успешном применении ферментных препаратов в текстильной, кожевельной, рыбоперерабатывающей, мясной и других отраслях промышленности (12, 13, 18). Ферментные препараты рассматриваются как мощное и перспективное средство для улучшения качества и повышения выхода пищевых

продуктов при их промышленном производстве (13).

Активно используют ферментные препараты, в частности протеазы, в медицинской практике при острых и хронических интоксикациях, при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, при лечении воспалительных процессов различной этиологии и некоторых видов опухолей (2, 7, 11, 20). Протеолитические ферменты широко представлены в природе. Они играют ключевую роль в обмене веществ, регулируя такие важные функции в организме, как иммунологические реакции, сосудистый тонус, процессы свертывания крови (2, 7).

Еще один важный аспект применения ферментных комплексов с широкой субстратной специфичностью, обнаруженных у микроорганизмов, существуют в сельском хозяйстве при решении проблемы кормовой базы в животноводстве и птицеводстве (1).

В настоящее время живые микробные культуры, в частности бактерии рода *Bacillus* с высокой биологической активностью с успехом применяют в качестве кормовых добавок. Так амилазы, продуцируемые бациллами, способствует расщеплению крахмалсодержащих компонентов кормов, протеазы воздействуют на протеины, липазы – на жиры (10). Бактериальные ферментные комплексы участвуют в процессах деградации различных по своему составу сырьевых компонентов корма и способствуют его оптимальному усвоению. Следует отметить, что производство таких пробиотических препаратов не предполагает применения сложных технологических процессов и больших материальных затрат, что является важным фактором для их более эффективного внедрения в практику сельского хозяйства. Микробиологическая промышленность уже производит ферментные препараты микробного происхождения, в том числе и из бацилл (протосубтилин, амилосубтилин и др.), которые применяются в кормопроизводстве (6). Данные ферменты способствуют расщеплению и усвоению высокомолекулярных белков и полисахаридов, и позволяют заменить дорогие компоненты корма на более дешевые (1, 12, 14, 21).

Несмотря на то, что в настоящее время выделено и описано множество штаммов микроорганизмов, способных продуцировать гидролитические ферменты, некоторые из них внедрены в производство, поиск новых высокоактивных продуцентов с различной субстратной специфичностью остается сегодня актуальной проблемой. Гидролазы микробного происхождения могли бы удовлетворить возрастающие потребности промышленности, медицины и сельского хозяйства в ферментах широкого спектра и в ряде случаев смогли бы заменить дорогие ферменты животного и растительного происхождения.

Задачей настоящей работы явилось исследование способности бактерий рода *Bacillus* гидролизовать различные субстраты с целью выявления среди этой группы микроорганизмов активных штаммов – продуцентов ферментов с широкой субстратной специфичностью.

Материалы и методы

Объектом исследования служили 226 штаммов 13 видов рода *Bacillus* из коллекции отдела антибиотиков Института микробиологии и вирусологии НАН Украины, изолированные из различных экониш и музейные культуры, полученные из других научных учреждений. Амилазную активность определяли по гидролизу крахмала на картофельном агаре (17). Чашки Петри, засеянные суточной культурой бацилл, через 24 – 48 часов заливали раствором Люголя. Образование светлых зон вокруг выросших колоний свидетельствовало о наличии активности.

Для оценки протеолитической активности бактерий были использованы белоксодержащие суб-

страты – эластин и казеин. Эластазную активность испытывали на 1%-ном эластиновом агаре (23). Способность выделенных штаммов бактерий гидролизовать казеин изучали на молочном агаре, приготовленном из равных частей обезжиренного молока и голодного агара (16).

Эластазную, амилазную и кazeиназную активности учитывали по диаметру зон гидролиза соответствующего субстрата от края колонии исследуемой культуры через 24 – 48 часов инкубации.

Обсуждение результатов

Сравнительный анализ результатов исследования ферментативной активности 226 штаммов бактерий рода *Bacillus*, относящихся к 13 видам показал, что только пять штаммов (2,2%) из испытанных, не гидролизовали крахмал и 106 штаммов (46,9 %) не расщепляли белковый субстрат – эластин.

Наиболее активными при расщеплении как углеводного, так и белкового субстратов были штаммы вида *B. subtilis*, который представлен в наших экспериментах наибольшим их количеством (165 штаммов), что является вполне закономерным. Известно, что данный вид бацилл является наиболее широко распространенным в природе и ему принадлежать определяющая роль в микробиоценозах разных экониш. Значительная часть исследованных штаммов *B. subtilis* проявляли высокий уровень амилазной активности, образуя зоны гидролиза больше 15 мм. Средний показатель эластазной активности был ниже и составил 13 мм (safron-fig1).

В большинстве случаев штаммы одного вида имели неодинаковый уровень ферментативной активности. Среди всех исследованных видов, *B. subtilis* выделялся также наибольшей гетерогенностью по степени амилазной (0–5) и эластазной (0–3) активностям, которые были определены как отношение D/d , где D – диаметр зоны гидролиза, а d – диаметр бактериальной колонии.

Штаммы видов *B. licheniformis* и *B. cereus* по уровню активности как амилазной, так и протеазной отличались в меньшей степени. Ферментативная активность видов *B. brevis*, *B. circulans*, *B. alvei*, *B. firmus*, *B. thuringiensis*, *B. polymyxa*, *B. megaterium*, *B. laterosporus* и *B. pumilus*, представленных наименьшим количеством штаммов (по 2 штамма), была довольно слабая или вообще отсутствовала.

Таким образом, проведенные исследования показали способность аэробных спорообразующих бактерий рода *Bacillus* к гидролизу углеводного (крахмального) и белкового (эластинового) субстратов. Проявление такой активности характерно для разных видов бактерий этого рода. Наибольшее количество активных штаммов, как по спектру, так и по уровню ферментативной активности, было выявлено среди представителей вида *B. subtilis*.

Изученные штаммы бактерий рода *Bacillus* были выделены из разнообразных экониш – почвы, воздуха, лечебных грязей озера Грутас Литвы и Шатской группы озер Украины, организмов человека и морской свинки. Представляло интерес выявить возможную зависимость между уровнем активности этих бактерий и источником их выделения. Полученные данные такого анализа показали, что степень и спектр ферментативной активности штаммов бацилл, выделенных из разных экониш, не имеет четкой корреляции с источником их выделения. Однако, большая часть штаммов *B.subtilis*, в том числе высокоактивных и *B.licheniformis* (93 и 4 соответственно), продуцирующих амилазу, а также 76 культур бацилл с эластазной активностью (72 штамма *B. subtilis*, 3 штамма *B. licheniformis*, 1 штамм *B.pumilus*) из 106, было изолировано из лечебных грязей (табл.1). Всего из лечебных грязей озер было выделено 33% штаммов с широкой субстратной специфичностью – продуцентов амилазы и эластазы и около 1 % – с узкой, обладающих только эластазной активностью. И все же полученные результаты не дают основания заключить, что существует выраженная зависимость в отношении источника выделения и степенью ферментативной активности культур или их субстратной специфичностью. Активные штаммы были выделены из различных экониш. Однако из лечебных грязей изолировано их значительное количество, так как эта экониша доминировала среди других по количеству представленных в исследовании штаммов.

В литературе имеются сведения, что некоторые протеолитические ферменты (эластаза и желатиназа), расщепляющие белки, недоступные для воздействия других протеаз могут способствовать проявлению патогенных свойств у аэробных спорообразующих бактерий, особенно штаммов, выделенных из патологического материала (8). Описаны отдельные случаи сепсиса, пищевых токсикоинфекций и других заболеваний, вызванных бациллами (4, 5). Следует отметить, что ни один из исследованных в данной работе штаммов бактерий рода *Bacillus* не был выделен из организма больных людей и животных. Все представленные в данной работе культуры характеризуются отсутствием вирулентных свойств и способности образовывать токсины. Большая часть из них являются отобранными в качестве перспективных для создания на их основе препаратов–пробиотиков.

В результате проведенного скрининга было получено 14 наиболее активных штаммов – продуцентов гидролитических ферментов с широкой субстратной специфичностью (табл.2). Отбор штаммов проводили по максимально полученному значению D/d, поскольку абсолютный размер зон гидролиза субстрата (в мм) без учета размера бактериальных колоний, вероятно, не может считаться

корректным критерием для отбора культур с высокой степенью активности.

Как видно из представленных данных, 13 отобранных штаммов– продуцентов относились к виду *B. subtilis* и 1 штамм – к виду *B. cereus*. Соотношение величин D/d в случае выявления у данных культур амилазной активности было выше 2,3, эластазной – выше 2. По уровню своей активности выделялись культуры *B. subtilis*, полученные из лечебных грязей (D/d у них было максимальным и составляло 3,0–4,3 и 2,0–2,9 для амилаз и протеаз соответственно).

Следует отметить, что отобранные штаммы бацилл способны гидролизовать не только углеводный субстрат и эластин, но также являются продуцентами казеиназ. Изучение гидролиза казеина–основного белка молока, показало, что уровень их активности по соотношению D/d соответствовал значениям от 3,0 до 4,0.

Полученные нами данные о гидролитической активности бацилл в отношении белков различной природы в определенной степени могут свидетельствовать о многокомпонентности продуцируемых бациллами протеаз, отражать сложность и интеграцию жизненных процессов, протекающих в этих микроорганизмах, а также их способность приспосабливаться к различным условиям жизни (15).

Широкая специфичность действия и высокая активность открывает перспективы для практического применения ферментных комплексов, продуцируемых микроорганизмами. Комплексные препараты из бактерий высокоэффективны, экологически безвредны, технологичны, получение их не требует больших затрат, что дает основание для их активного внедрения в сельское хозяйство, пищевую промышленность и медицину. При этом возможно применение, как чистых культур, так и выделенных из них очищенных ферментов.

Изучение ферментативной активности, выделенных из разных экониш штаммов бацилл позволило оценить биологический потенциал данной группы микроорганизмов. Получены штаммы – продуценты гидролитических ферментов с широкой субстратной специфичностью. Однако, потенциальные возможности микробных культур в отношении синтеза различных ферментных систем значительно выше, установленных при первичном скрининге в данной работе. Важным фактором, определяющим более высокий уровень продукции различных метаболитов, является регуляция биосинтеза этих веществ у микроорганизмов. Для этого необходимо изучение физиологических потребностей штаммов –продуцентов и установление оптимальных условий для их культивирования. Однако эти задачи будут решаться в дальнейших исследованиях.

Таблица 1. Штаммы аэробных бацилл с амилазной и эластазной активностью, выделенные с различных экониш

Вид бактерий	Общее количество штаммов	Источник выделения					
		Почва	Лечебные грязи	ЖКТ* человека	Кровь морской свинки	Фекалии морской свинки	Музейные
α- амилаза							
<i>Bacillus subtilis</i>	162	22	93	7	10	16	14
<i>B. licheniformis</i>	14	—	4	3	5	—	2
<i>B. cereus</i>	13	1	—	—	2	—	11
<i>B. megaterium</i>	8	4	—	—	—	—	4
<i>B. pumilus</i>	8	—	—	—	5	—	3
<i>B. alvei</i>	2	—	—	—	—	—	2
<i>B. coagulans</i>	2	—	—	1	—	—	1
<i>B. brevis</i>	2	—	—	—	—	—	2
<i>B. circulans</i>	2	—	—	—	—	—	2
<i>B. firmus</i>	2	—	—	—	—	—	2
<i>B. thuringiensis</i>	2	—	—	—	—	—	2
<i>B. polymyxa</i>	2	2	—	—	—	—	—
<i>B. laterosporus</i>	2	—	—	—	—	—	2
Всего	221	28	97	11	22	16	47
эластаза							
<i>B. subtilis</i>	98	1	72	3	—	13	9
<i>B. licheniformis</i>	6	—	3	2	1	—	—
<i>B. cereus</i>	7	—	—	—	—	—	7
<i>B. megaterium</i>	3	3	—	—	—	—	3
<i>B. pumilus</i>	2	—	1	—	—	—	1
<i>B. alvei</i>	1	—	—	—	—	—	1
<i>B. coagulans</i>	1	—	—	—	—	—	1
<i>B. brevis</i>	1	1	—	—	—	—	—
<i>B. circulans</i>	1	—	—	—	—	—	1
<i>B. firmus</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. thuringiensis</i>	2	—	—	—	—	—	2
<i>B. polymyxa</i>	2	1	—	—	—	—	1
<i>B. laterosporus</i>	2	—	—	—	—	—	2
Всего	120	6	76	5	1	13	29

Примечание: * – ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

Таблица 2. Характеристика штаммов аэробных бацилл – наиболее активных продуцентов гидролитических ферментов

Штаммы	Ферментативная активность, D/d		
	Амилазная	Эластазная	Казеиновая
<i>Bacillus subtilis</i> 103	2,6	2,2	3,0
<i>B. subtilis</i> 138(3)–2	2,5	2,0	3,6
<i>B. subtilis</i> МС–2 ₂	2,7	2,2	2,9
<i>B. subtilis</i> 59 ЛГ	4,3	2,0	3,4
<i>B. subtilis</i> 61 ЛГ	3,2	2,7	3,8
<i>B. subtilis</i> 76 ЛГ	3,0	2,0	3,1
<i>B. subtilis</i> 85 ЛГ	2,5	2,0	3,5
<i>B. subtilis</i> 87 ЛГ	3,4	2,6	3,6
<i>B. subtilis</i> 93 ЛГ	3,5	2,7	4,0
<i>B. subtilis</i> 94 ЛГ	2,7	3,0	3,7
<i>B. subtilis</i> 98 ЛГ	2,3	2,0	3,4
<i>B. subtilis</i> 100 ЛГ	3,0	2,4	3,2
<i>B. subtilis</i> 101 ЛГ	3,0	2,2	3,3
<i>B. cereus</i> 91 КГУ	2,8	2,0	3,1

1. Алмантас Шимкус, Вигимеюс Юкна. Влияние пробиотических препаратов на продуктивность сельскохозяйственных животных //Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функции. продукты питания:– Матер. междунар.конф.– М., 2004.– С. 167–168
2. Бондаренко В. М., Воробьев А. А. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией // ЖМЭИ.– 2004.– №1. – С. 84–92.
3. Галич И. П. Амилазы микроорганизмов. – Киев: Наукова думка, 1987. – 192 с.
4. Доценко В. Л., Спирина А. Я., Макинский А. И. и др. Эластаза лейкоцитов в плазме крови больных туберкулезом и ее роль в нарушении регуляции процессов свертывания крови // Вопросы мед. химии.–2000.–№2. – С.1–9.
5. Затула Д. Г., Резник С. Р. Влияние метаболитов споровых сапрофитных бактерий на организм человека и животных. – Киев:Наук.думка, 1973. – 118 с.
6. Калунянц К. А., Ездаков Н. В., Пивняк И. Г. Применение продуктов микробиологического синтеза в животноводстве. – М.: Колос, 1980.– 288 с.
7. Корпан М. И., Чекман И. С., Фиалка–Мозер В. Протеолитические ферменты – клинико–фармакологическая эффективность //Вчені Поділля, 1999. – ч .2, Хмельницький, С. 135–138.
8. Кудрявцев В. А., Резник С. Р., Чуркина Л. Н., Вьюницкая В. А. Ферментативная активность спорообразующих бактерий, изолированных из организма человека // Микробиол. журн.– 1981. – 43, №6.– С. 696–702.
9. Лория Ж. К., Летунова Е. В., Егоров Н. С. Влияние аэрации на образование протеолитических ферментов *Bacillus megaterium* // Микробиология. – 1974.–43, №3. – С. 428–431.
10. Марченков Ф., Сунгуров А., Баширов О. Комплексный подход к применению кормового пробиотика Биоплюс 2 Б в сочетании с антибиотикотерапией // Эффективне птах–во та тварин–во. – 2004. – №3. – С. 29–30.
11. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты.– М.:Наука, 1971.– 404 с.
12. Производство и применение ферментных препаратов в сельском хозяйстве. – М., 1972. – Обзор ОНТИТЭМикробиопром.
13. Рид Д. Ферменты в пищевой промышленности.– М.: Пищевая промышленность, 1971. – 414 с.
14. Рустамова М. А., Ахмедова З. Р., Гулямова З. Т., Гулямова И. Т. Исследование ферментных комплексов местных микробных продуцентов для получения медицинских препаратов // 3–й Московский междунар. конг. "Биотехнология:состояние и перспективы развития ". М., 14–18 марта 2003 г., М., 2005, ч.1. – с. 172
15. Слабоспицкая А. Т., Крымовская С. С., Резник С. Р. Ферментативная активность бацилл, перспективных для включения в состава биопрепаратов //Микробил.журн.– 1990. – 52, №2. – С. 9–14.
16. Смирнов В. В., Резник С. Р., Василевская И. А. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ. – К.: Наукова думка, 1982. – 280 с.
17. Смирнов В. В., Резник С. Р., Сорокулова И. Б. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных. – Киев, 1983. – 49 с.
18. Фениксова Р. В. Гидролитические ферменты микроорганизмов и их применение в народном хозяйстве. – М.: Наука, 1972. – 36 с.
19. Цурикова Н. В., Нефедова Л. И., Костылева Е. В.и др. Получение активного штамма *Bacillus licheniformis* – продуцента термостабильной α -амилазы //Прикл. биохимия и микробиол.– 2002. – 38, №5. – С. 502–508.
20. Пат. СССР 1723117 С12N1/20. Штамм бактерии *Bacillus pulvificiens*, используемый для изготовления лечебно–профилактического препарата против бактериальной инфекции у животных / Никитенко В. И., Никитенко И. К., Пау С. М. – Оpubл. 1992, Бюл. №12.
21. Пат. СССР 1824194 А61К 35/74. Способ повышения продуктивности и сохранности поросят в возрасте 30–120 дней / Жданов П. И., Никитенко В. И., Лепский А. И. Оpubл. 1993, Бюл. №24.
22. De Clerck E., De Vos P. Study of the bacterial load in a gelatine production process focussed on *Bacillus* and related endospore-forming genera // Syst.and Appl. Microbiol.– 2002. – 25, N4. – P. 611–617.
23. Morichara K. Production of elastase and proteinase by *Pseudomonas aeruginosa* // J.Bacteriol. – 1964. – 88, N3. – P. 745–750.

Отримано: 16 червня 2006 р.

Прийнято до друку: 17 червня 2006 р.