

УДК 579.152.3

Л.В. Авдєєва, А.І. Осадча, Л.А. Сафронова, В.М. Іляш, М.А. Хархота

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д 03680, Україна*

ВПЛИВ рН ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА НА БІОСИНТЕЗ ГІДРОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ У БАЦИЛ

*Вивчено вплив рН середовища культивування на біосинтез бактеріями роду *Bacillus* різного типу гідролаз. Підібрані оптимальні для кожного із досліджуваних ферментів величини рН середовища, що дозволило збільшити активність біосинтезу ксиланаз та ліпаз в 1,3–1,5 рази, ендоглюканаз – в 4–5 разів, целюлази – в 18–20 разів та пектиназ – більш ніж в 2 рази.*

*Ключові слова: гідролази, бактерії роду *Bacillus*, умови культивування.*

За даними різних дослідників гідролітичні ферменти мікроорганізмів (ферменти целюлозолітичного комплексу, ксиланаз, ліпази та інші) відносяться в основному до індукцйбельних ферментів, що визначає їх різні вимоги як до складу поживного середовища, так і до умов культивування, зокрема, до кислотності поживного середовища тощо [6].

Біосинтез та активність ферментів залежать від кислотності середовища, в якому культивуються їх продуценти. Коливання активної кислотності в той чи в інший бік від оптимуму викликає зміну ферментативної активності, що пояснюється різною здатністю до утилізації специфічних субстратів, які необхідні для біосинтезу ферментів.

Тому одним із шляхів підвищення біосинтетичної здатності продуцентів без зміни їх генетичного апарату є регулювання параметрів їх культивування шляхом зміни не тільки кількісного і якісного складу поживного середовища, але й ряду інших чинників (рН, температура тощо).

Дані про оптимізацію поживних середовищ для біосинтезу гідролаз різними мікроорганізмами представлені лише в окремих публікаціях [2, 8–10].

Метою даної роботи було вивчення залежності біосинтезу бактеріями роду *Bacillus* гідролаз різного типу від початкового значення рН на середовищах із відповідними специфічними вуглецевмістними субстратами.

Матеріали і методи. В роботі використано 36 культур бактерій роду *Bacillus* з колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАНУ, що пройшли етапи скринінгу та відібрані за найбільшою активністю позаклітинних гідролітичних ферментів [4, 5].

Культивування бактерій проводили протягом 48 год при температурі 37 °С в колбах ємністю 750 мл з 50 мл середовища на качалці з 200 об/хв на рідкому поживному середовищі, раніше оптимізованому нами для глибинного культивування бацил, що забезпечує їх добрий ріст та накопичення біомаси, наступного складу (у г/л): натрію 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, кукурудзяний екстракт – 0,5 % рН 7±0,2 [3]. В попередніх експериментах, не міняючи якісного складу середовища, були оптимізовані співвідношення його компонентів для кожного з досліджуваних гідролітичних ферментів, які забезпечували їх підвищений біосинтез та високу активність. Для біосинтезу гідролаз бактеріями до оптимізованих варіантів середовища додавали відповідні специфічні для кожного з ферментів субстрати (в %): для отримання ксиланаз – ксилан 1,0; целюлази (ендоглюканази) – Na-КМЦ (натрієву сіль карбоксиметилцелюлози) 0,5; β-глюкозидази – целюбіозу 0,2; пектиназ – пектин 0,5; ліпази – маслинну олію 0,5. Після вирощування відокремлювали культуральну рідину від клітин центрифугуванням протягом 20 хв при 6000 об/хв та визначали ферментативні активності у відповідних супернатантах за загальноприйнятими методиками [4, 6, 11]. Активність ферментів виражали в од/мл.

Знаходження оптимального значення рН середовища проводили з використанням математичного методу планування експерименту – методу ортогональних латинських прямокутників для цього чинника на чотирьох рівнях [1]. Для кожного ферменту було перевірено 24 варіанти

© Л.В. Авдєєва, А.І. Осадча, Л.А. Сафронова, В.М. Іляш, М.А. Хархота, 2010

середовища з одночасним варіюванням усіх її компонентів та зміни значення рН від 4,0 до 10,0. Варіант на середовищі з рН $7,0 \pm 0,2$ був контрольним. Потрібні значення рН встановлювали підтітровою середовища 10 % розчинами соляної кислоти чи лугу натрію.

Результати оптимізації складу поживних середовищ і їх значення при синтезі досліджуваних гідролаз висвітлені нами в інших публікаціях [4, 5]. У даній роботі подані результати залежності цього процесу тільки від одного з чинників культивування, а саме, кислотності середовища.

Математична обробка результатів експериментів полягала в розрахунку величин ефектів впливу кожного з чинників (у даній роботі – різні значення рН середовища) на активність процесу біосинтезу ферментів [1]. Ефект кожного із значень чинника знаходили за різницею між середнім значенням виходу ферменту у тих варіантах досліду, де даний чинник знаходився на одному з рівнів рН, і середнім значенням виходу ферменту для серії всіх варіантів досліду при різних досліджуваних рН [1]. Величина ефекту із знаком «+» показує, що даний рівень чинника покращує, із знаком «-» – погіршує активність ферменту порівняно з його значенням на вихідному середовищі.

Ріст бактерій на середовищі з різними субстратами і при різному значенні рН оцінювали вимірюванням оптичної густини суспензії, що виросла, на фотоелектроколориметрі ФЕК-56 при 540 нм, рН – потенціометрично.

Результати та їх обговорення. У процесі проведення власних попередніх досліджень визначено, що за допомогою величини рН поживного середовища представляється можливим направлено підвищувати синтез гідролітичних ферментів у бацил. У даній роботі в результаті з'ясування значущості початкового значення рН поживного середовища при біосинтезі ферментів бацилами на підставі ефектів впливу цього показника, що розраховуються за отриманими результатами досліджень, на їх активність були встановлені його оптимальні величини для кожного з досліджуваних ферментів, і на їх основі потім реалізовані нові варіанти середовища з врахуванням цього чинника (табл. 1).

З даних табл. 2 видно, що при експериментально встановленому оптимальному для ксиланази, що секретується різними штамами бактерій, значенні рН середовища, рівним 8,0, рівень її був вищим, ніж до оптимізації і знаходився в межах $193,2 \pm 9,8 - 434,7 \pm 25,2$ од/мл. Тобто в ході оптимізації у відібраних у результаті скринінгу штамів вдалося збільшити активність ферменту в 1,3 рази порівняно з їх активністю на вихідному середовищі з рН 7,0, при якому рівень активності ксиланази досягав $145,3 \pm 8,7 - 328,4 \pm 15,1$ од/мл. При цьому в присутності ксилану як джерела вуглецю бактерії росли значно швидше, що пояснюється не тільки збалансованістю для росту середовища, але й умовами культивування, що створювалися для активного біосинтезу ксиланази на ньому.

Крім того, оптимальні значення рН поживного середовища позитивно відбивалися і на підвищенні активності ферментів іншого ферментного комплексу – целюлозолітичного. Як видно з табл. 3, ендоглюканазна активність підвищувалася в 4–5 разів, целобіазна активність – в 18–20 та більше разів порівняно з вихідним середовищем з рН 7,0.

Біосинтез бацилами пектинази, ліпази та целюлази був найбільш ефективним при більш низьких значеннях рН оптимізованого середовища, а саме 4,0 і 6,0 відповідно, ніж на вихідному середовищі. При відхиленні рН від оптимуму в той чи інший бік активність целюлази знижувалася в 1,2–2,4 рази. Низькі значення рН поживного середовища за наявними відомостями більш надійно захищають процес ферментної конверсії субстрату від інфікування сторонньою мікрофлорою, тому їх традиційно використовують для отримання целюлази з грибів [7]. Для бацил наявні дані досить суперечливі. За одними даними оптимальним рН для біосинтезу ними целюлази вважають від 5,0 до 6,5, за даними інших – більш нейтральну область [9].

Нами встановлено, що низькі значення рН середовища у досліджуваних бацил сприяли також активності пектинази: зростанню пектинестерази в 2–2,5, а полігалактуронози – до 2,0–2,5 рази порівняно з їх активністю на початковому середовищі ($0,405$ і $3,2$ од/мл відповідно) (табл. 4). В міру зростання рН середовищ пектолітична активність за ПГ (полігалактуронозою) вже знижувалася в 1,2–4,1 рази та за ПЕ (пектинестеразою) в 6,4, а іноді навіть в 33,4 рази. За даними літератури максимальний синтез пектолітичних ферментів спостерігали навіть при рН, пониженому до 3,5. Проте відносно бацил зустрічаються частіше дані про пектинази лужного характеру [8].

Підтримування рН середовища на рівні 4,0 викликало подібний ефект і для активного синтезу також і ліпази. Активність ліпази підвищувалася приблизно в 1,2–1,5 рази одночасно при накопиченні бактеріальної біомаси на оптимізованому середовищі при використанні як єдиного джерела вуглецю – маслинної олії.

Одержані результати дозволяють зробити висновок про те, що ліпази, які продукуються досліджуваними штамми бацил, мають кислий характер з оптимумом рН, меншим за 6,0. В той же час відомо, що для біосинтезу ліпаз іншими мікроорганізмами оптимальними є значення рН, що наближаються до нейтральних областей. Деяким авторам вдалося серед ферментів бацил виявити ліпази, навіть лужні [2, 10].

Таким чином, отримані експериментальні результати показали, що шляхом встановлення оптимального показника кислотності середовища був отриманий вищий рівень позаклітинних ферментів, ніж при його початковому значенні. Оптимум рН для біосинтезу ферментів досліджуваними штамми не завжди збігався з рН-оптимумом для їх росту. Ріст бацил спостерігався незалежно від початкових значень рН від 4,0 до 10,0 і в процесі вирощування зрештувався, як правило, у бік лужних значень, доводячи його до кінця культивування до 8,0–8,5 і навіть вище, що на практиці може негативно позначитися на процесі біосинтезу ферментів і вимагатиме введення в середовище буферних розчинів із збереженням відповідного для того або іншого ферменту значення рН.

Виходячи з одержаних результатів із врахуванням експериментально знайдених рН-оптимумів середовища для більш активного біосинтезу гідролітичних ферментів, продукуюваних бацилами гідролази: зокрема ліпази, пектинази та целюлази (з рН-оптимумом середовища 4,0–6,0) було умовно визначено як кислі, а ксиланази та β-глюкозидази (з оптимумом рН 8,0 і вищим) – як лужні.

Таким чином, можна заключити, що досліджуваним культурам бацил властива висока ферментна гідролітична активність, зокрема целюлозолітична, ксиланазна, пектолітична та ліполітична, але повна оцінка якої в них як продуцентів можлива лише при створенні оптимальних для біосинтезу умов, що й дозволить якнайповніше виявити приховані можливості біосинтезу різних біологічно активних продуктів, зокрема ферментів.

Таблиця 1

Ефекти впливу різних значень рН середовища на ферментативну активність бацил роду *Bacillus*

Продукований фермент	Ефекти впливу на ферментну активність бацил при різних значеннях рН середовища			
	4,0	6,0	8,0	10,0
Ендоглюканаза	+105,0	+ 161,7*	+ 58,4	- 325,0
Целобіаза	- 452,3	- 465,6	- 453,9	+ 1437,7*
Ксиланаза	-2,46	- 0,17	+ 1,63*	+ 1,02
Пектинестераза	+3,28*	- 0,77	0	0
Полігалактуроназа	+0,20	+ 0,245*	- 0,12	- 0,32
Ліпаза	+45,4*	+ 8,0	- 23,1	0

Примітка: Значення ефектів впливу на активність ферментів наведені в од/мл. * – величина ефекту зі знаком «+» показує, що даний рівень чинника покращує, зі знаком «-» – погіршує активність ферменту порівняно з його значенням на вихідному середовищі.

Таблиця 2

Ростова та ксиланазна активність бацил при різних рН оптимізованого середовища

Культура	Активність ксиланази, од/мл		Біомаса, од. оптичної густини	
	при рН середовища			
	8,0	7,0	8,0	7,0
<i>B. subtilis</i> MC-13 ₂	434,7±25,2	328,4±15,1	8,1±1,0	6,2±0,9
<i>B. subtilis</i> 80 ЛГ	425±21,0	312,4±10,5	3,05±0,51	2,05±0,05
<i>B. subtilis</i> 1155	212,5±12,5	155,3±9,8	2,5±0,11	1,89±0,01
<i>B. subtilis</i> 39 ЛГ	357,4±20,4	262,7±9,7	6,0±0,20	5,7±0,5
<i>B. subtilis</i> 51 ЛГ	281,5±15,1	207,1±7,5	3,2±0,09	2,9±0,05
<i>B. megaterium</i> 906	289,8±15,0	210,5±5,9	2,9±0,11	1,85±0,04
<i>B. licheniformis</i> A ₆₃	193,2±9,8	145,3±8,7	1,6±0,05	0,95±0,02

Целюлозолітична активність різних штамів бацил (в од/мл) на оптимізованому середовищі при різних значеннях рН

Штам	Ендоглюканаза		β-глюкозидаза	
	рН середовища			
	7,0	6,0	7,0	10,0
<i>B. subtilis</i> 55 ЛГ	1016±10,1	5526±125	-	-
<i>B. subtilis</i> 229 ж	2015,2±15,0	10076±131	-	-
<i>B. subtilis</i> 30S	706,0±9,8	3753±98	-	-
<i>B. subtilis</i> 872	698,5±7,5	3653±39	-	-
<i>B. subtilis</i> A _{5/1}	2085,6±20,8	10428±101	85,1±3,5	1670±51
<i>B. subtilis</i> A _{5/2}	3356,0±25	18680±198	75,2±4,9	1680±48
<i>B. cereus</i> 63/4	777,3±8,7	3919±57	-	-
<i>B. oligonitrophilus</i>	998,0±5,5	5364±65	-	-
<i>B. silvestris</i> A ₁₀	2100±18,1	10480±151	71,8±3,8	1660±27
<i>B. licheniformis</i> A _{6/3}	2301±15,7	11660±201	70,2±2,7	1670±35
<i>B. subtilis</i> MC-22	-	-	79,1±3,9	1720±51
<i>B. subtilis</i> MC-13 ₂	-	-	90,5±5,8	1690±31
<i>B. subtilis</i> MC-63	-	-	88,8±4,7	1690±25
<i>B. subtilis</i> 45ЛГ	-	-	68,5±5,0	1670±30
<i>B. subtilis</i> 49 ЛГ	-	-	71,2±4,2	1670±27
<i>B. subtilis</i> 51 ЛГ	-	-	70,5±3,9	1765±21
<i>B. subtilis</i> 39 ЛГ	-	-	75,5±5,1	1660±25
<i>B. species</i> A ₇	-	-	79,3±3,8	1870±28

Примітка: «-» – активність не визначалася.

Таблиця 4

Вплив рН середовища на пекто- та ліполітичну активність бацил (в од/мл) на оптимізованому середовищі

Штам	Пектолітичний комплекс				Ліпаза	
	Пектинестераза		Полігалактураназа			
	рН середовища					
	7,0	4,0	7,0	6,0	7,0	4,0
<i>B. subtilis</i> 39 ЛГ	0,405±3,5	1,43±0,02	3,2±0,7	8,3±1,1	24,4±3,0	28,5±5,1
<i>B. subtilis</i> 51 ЛГ	0,20±2,1	0,43±0,01	2,7±0,5	3,7±0,05	7,5±1,8	8,4±1,7
<i>B. subtilis</i> 1155	0,36±2,1	0,77±0,02	3,0±0,5	6,1±0,05	23,5±2,1	25,0±6,7
<i>B. subtilis</i> 36 ЛГ	0,41±1,8	1,5±0,02	3,1±0,6	7,2±0,07	22,1±1,9	25,0±2,8
<i>B. subtilis</i> 1701	0,40±3,0	1,58±0,04	2,8±0,53	3,7±0,01	-	-
<i>B. subtilis</i> 668	-	-	-	-	24,0±2,2	28,0±5,1
<i>B. subtilis</i> 19ЛГ	-	-	-	-	6,5±0,9	7,5±1,8
<i>B. licheniformis</i> A _{6/3}	0,21±1,7	0,36±0,02	0,5±0,7	5,1±0,8	24,4±2,5	34,5±6,1
<i>B. megaterium</i> 906	0,40±4,0	1,6±0,04	5,1±0,2	10,0±1,1	23,2±2,1	34,5±7,8
<i>B. cereus</i> ВКМ 504	0,22±2,0	0,46±0,01	2,9±0,2	5,1±0,07	-	-
<i>B. pumilus</i> 21	0,27±2,3	0,62±0,02	3,0±0,5	7,0±0,9	-	-

Примітка: «-» – не визначали.

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

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

ВЛИЯНИЕ pH ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА БИОСИНТЕЗ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ У БАЦИЛЛ

Резюме

Изучено влияние pH среды культивирования на биосинтез бактериями рода *Bacillus* разного типа гидролаз. Подобраны оптимальные для каждого из исследуемых ферментов величины pH среды, которые позволили повысить активность продуцируемых ксиланаз и липаз в 1,3–1,5 раза, эндоглюканаз – в 4–5 раза, целлюлазы – в 18–20 раз и пектиназ – более, чем в 2 раза.

Ключевые слова: гидролазы, бактерии рода *Bacillus*, условия культивирования.

L. V. Avdeeva, A. I. Osadchaya, L. A. Safronova, V.M. Ilyash, M.A. Kharkhota

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

INFLUENCE OF NUTRIENT MEDIUM PH ON BIOSYNTHESIS OF HYDROLYTIC ENZYMES IN BACILLI

S u m m a r y

The effect of pH value of cultivation medium on biosynthesis by bacteria of *Bacillus* genus of different types of hydrolases has been studied. The optimum pH medium values for each of the studied enzymes were chosen that allowed to increase the activity of produced xylanases and lipases – 1.3-1.5 times, endoglucanases – 4-5 times, cellobiases – 18-20 times and pectinases more than 2 times.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: hydrolases, bacteria of *Bacillus* genus, conditions of cultivation.

The author's address: *Avdeeva L.V.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Бирюков В.В. Практическое руководство по применению математических методов планирования эксперимента для поиска оптимальных условий в многофакторных процессах. – Рига: Зинатне, 1969. – 79 с.
2. Логинова Л.Г., Иванова И.И., Гужова Э.П., Храпцова Г.И., Исмаилова Д.Ю., Бурденко Л.Г. Целлюлазы термофильных микроорганизмов // Проблемы биоконверсии растительного сырья. – М.: Наука, 1986. – С. 165–191.
3. Осадчая А.И., Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А. Стимуляция роста и спорообразование *Bacillus subtilis* оптимизацией углеводного питания при глубинном культивировании // Прикладная биохимия и микробиология. – 1997. – 33, № 3. – С. 321–324.
4. Осадчая А.И., Сафронова Л.А., Авдеева Л.В., Иляш В.М. Скрининг штаммов бактерий с высокой целлюлазной активностью // Микробиол. журн. – 2009. – 71, № 5. – С. 41–48.
5. Осадчая А.И., Сафронова Л.А., Авдеева Л.В., Иляш В.М. Способность бактерий рода *Bacillus* гидролизывать ксилан // Микробиология і біотехнологія. – 2009. – № 3. – С. 25–28.
6. Рухлядева А.П., Полягалина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. – М.: Легк. и пищ. промышленность. 1981. – 288 с.
7. Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Гончарук Ю.Н., Дробот Е.И. и др. Кислородзависимая и нитроксидзависимая ферментная системы макрофагов при стафилококковой и листериозной инфекциях // ЖМЭИ. – 2006. – № 3. – С. 39–43.
8. Штейн И.В., Арендс И.М., Сорокина Т.А., Горшкова Е.В., Калуняц К.А. Отбор микроорганизмов, синтезирующих щелочную липазу // Биотехнология. – 1989. – 5, № 2. – С. 133–136.
9. Fukumori, Hudo, Horikoshi. Purification and properties of a cellulase from alkalophilic *Bacillus* sp. № 1139 // J. of Gen. Microbiol. – 1985. – 131. – P.3339–3345.
10. Hasan Fariha, Shah Aamer Ali, Hameld Abdul. Influence of culture conditions on lipase production by *Bacillus* FH5 // Ann. Microbiol. – 2006. – 56, N3. – P. 247 – 252.
11. Ota Y., Yamada Y. Lipase from *Candida parapolitica*. Part 1. Anionic surfactants as the essential activator in the systems emulsified by polyvinyl alcohol // Agric. Biol. Chem. – 1966. – 30. – P. 351–358.

Отримано 11.09.2009