

УДК 577.15:579.22

Романова М.В., Белодед А.В.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕРМОФИЛЬНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕАЗ *BACILLUS VELEZENSIS*

Романова Мария Васильевна, студентка 1 курса магистратуры факультета биотехнологии и промышленной экологии, email: romanovamariav@gmail.com;

Белодед Андрей Васильевич, к.б.н., доцент кафедры биотехнологии;

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20

В работе были изучены физиологические и биохимические свойства термофильного штамма Bacillus velezensis, который ранее был охарактеризован как перспективный продуцент термостабильных внеклеточных протеаз. На основании способности утилизировать различные углеводы и анализа внеклеточных ферментативных активностей были сделаны выводы о возможности использования разнообразных субстратов для культивирования. Помимо протеолитических ферментов штамм способен продуцировать также внеклеточные амилазы и целлюлазы, которые потенциально могут быть выделены и охарактеризованы.

Ключевые слова: термофильные бактерии; Bacillus velezensis; источник углерода; ферментативная активность.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THERMOPHILIC PRODUCER STRAIN OF EXTRACELLULAR PROTEASE *BACILLUS VELEZENSIS*

Romanova M.V., Beloded A.V.

D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia.

In this work the physiological and biochemical properties of thermophilic strain Bacillus velezensis were studied. Strain was previously determined as promising producer of thermostable extracellular proteases. Based on ability assessment of various carbohydrates utilization and analysis of enzymatic activities the conclusions were made about ability to use diverse substrates for cultivation. Besides proteolytic enzymes the strain is able to produce extracellular amylases and cellulases which could potentially be isolated and characterized.

Kew words: thermophilic bacteria; Bacillus velezensis; carbon sources; enzyme activity.

В настоящее время большое внимание в биотехнологии привлекают термофильные микроорганизмы. Ускоренный метаболизм, высокая продуктивность и наличие уникальных метаболических путей позволяют получать различные продукты: органические кислоты, белки, ферменты [1, 2]. Термостабильные ферменты, как правило, обладают устойчивостью не только к повышенным температурам, но и к экстремальным значениям pH. Некоторые из ферментов характеризуются стабильностью в присутствии органических растворителей, окислителей и поверхностно-активных веществ [3]. Бактерии рода *Bacillus* являются продуцентами различных соединений, в том числе внеклеточных гидролитических ферментов, среди которых встречаются протеазы, амилазы, целлюлазы, ксиланазы, липазы и другие [4]. Изучение биохимических и физиологических особенностей штамма-продуцента является необходимым для выбора способов культивирования. Способность к утилизации различных моно- и олигосахаридов делает возможным использование как отдельных углеводов, так и углеводсодержащих гидролизатов растительного сырья в качестве субстрата [5]. Наличие секретируемых ферментов позволяет использовать штамм для их получения, а также

должно быть учтено при разработке состава питательной среды для биосинтеза других метаболитов.

Целью данной работы являлась биохимическая и физиологическая характеристика штамма термофильных бактерий, оценка способности потреблять различные углеводные субстраты и анализ внеклеточных гидролитических активностей.

Ранее нами был выделен штамм термофильных бактерий Кб.1.Гл.8, который был охарактеризован как перспективный продуцент протеолитических ферментов и предварительно отнесен к роду *Bacillus*. По результатам анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамм был идентифицирован как *Bacillus velezensis*.

Для дальнейшей характеристики штамма изучали способность утилизировать различные углеводы и проверяли наличие внеклеточных гидролитических ферментов. В анализе использовались различные моно- и олигосахариды: арабиноза, ксилоза, глюкоза, фруктоза, галактоза, манноза, дульцит, маннит, рамноза, сорбоза, мальтоза, сахароза, лактоза и раффиноза. Штамм культивировали в течение суток при 50°C на средах следующего состава (г/л):

триптон – 10, углевод – 10, дрожжевой экстракт – 1, NaCl – 5, феноловый красный – 0,018. Изменение цвета индикатора в среде свидетельствовало о наличии или отсутствии утилизации сахара.

Обнаружение внеклеточных гидролитических активностей проводили на агаризованных средах, содержащих различные субстраты и позволяющих визуально определить зоны гидролиза (рис. 1). Амилазную и целлюлазную активности выявляли на агаризованных средах, содержащих 1% крахмала и 1 % карбоксиметилцеллюлозы соответственно, при окрашивании чашек йодным раствором после появления колоний микроорганизмов. Появление желтых зон на синем фоне среды указывало на наличие внеклеточных амилаз, светло-коричневых зон на коричневом фоне среды – внеклеточных целлюлаз. Липазную активность определяли методом лунок в агаре на средах, содержащих 1% оливкового масла и Tween-80. Способность к гидролизу указанных субстратов отмечали при образовании нерастворимых солей жирных кислот вокруг лунок на агаре с твином и одновременном пожелтении индикатора в среде и образовании нерастворимых солей вокруг лунок на агаре с феноловым красным и оливковым маслом. Для обнаружения лецитиназной активности штаммы высевали на желточный агар. Гидролиз лецитина отмечали при образовании белого непрозрачного слоя нерастворимых диацилглицеридов. Протеолитическую активность определяли по зонам просветления вокруг колоний, выросших на молочном агаре.

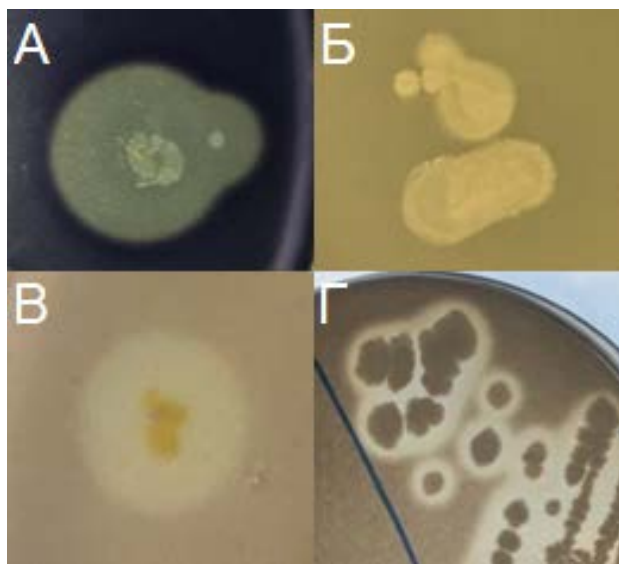


Рисунок 1. Тесты на ферментативную активность штамма *Bacillus velezensis* К6.1.Гл.8: А – амилазная активность, Б – лецитиназная активность (отсутствует), В – целлюлазная активность, Г – протеолитическая активность

Полученные результаты тестов сопоставили с характеристикой родственных *Bacillus velezensis* штаммов *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* с использованием справочника Берджи[6].

Сравнительная характеристика указанных штаммов приведена в табл. 1.

Таблица 1. Физиолого-биохимическая характеристика исследуемого штамма *Bacillus velezensis* в сравнении с родственными видами р. *Bacillus*. «+» - положительный результат, «-» - отрицательный результат, «v» - результат варьируется у разных штаммов одного вида

Характеристика	<i>Bacillus velezensis</i> К6.1.Гл.8	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Первичная физиолого-биохимическая характеристика			
Форма клеток	Палочки	Палочки	Палочки
Спорообразование	+	+	+
Аэробный рост	+	+	+
Каталаза	+	+	+
Уреаза	+	v	v
Разжижение желатина	+	+	+
Потребление моно- и олигосахаридов			
L-Арабиноза	+	+	v
D-Ксилоза	+	+	v
Глюкоза	+	+	+
Сорбоза	-	-	-
Рамноза	-	-	-
Фруктоза	+	+	+
D-Галактоза	-	v	v
Дульцит	-	-	-
D-Манноза	+	+	v
D-Маннит	+	+	+
Сахароза	+	+	+
Мальтоза	+	+	+
Лактоза	-	v	v
Раффиноза	-	+	+
Внеклеточные ферментативные активности			
Гидролиз казеина	+	+	+
Гидролиз крахмала	+	+	+
Гидролиз КМЦ	+	+	+
Гидролиз Tween-80	-	v	v
Гидролиз оливкового масла	-	v	v
Лецитиназа	-	-	-

По результатам работы была составлена расширенная физиолого-биохимическая характеристика термофильного штамма К6.1.Гл.8, которая подтвердила его сходство с близкородственными штаммами бактерий рода *Bacillus*. В ходе исследований было установлено, что исследуемый штамм *Bacillus velezensis* способен потреблять различные моносахариды (арабинозу, ксилозу, глюкозу, фруктозу, маннозу, маннит) и

некоторые дисахариды (сахарозу, мальтозу). Результаты проведенных тестов можно использовать при разработке состава питательной среды. Штамм является продуцентом потенциально термостабильных внеклеточных амилолитических и целлюлолитических ферментов.

Список литературы

1. Kamran A., Ur Rehman H., Ul Qader S., Baloch A. H., Kamal M. Purification and characterization of thiol-dependent, oxidation-stable serine alkaline protease from thermophilic *Bacillus* sp. // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2015. Vol. 13. № 1. P. 59-64.
2. Gerday C., Glansdorff N. Physiology and Biochemistry of Extremophiles // edited by C. Gerday and N. Glansdorff. ASM Press. Washington, DC. 2007. 450 p.
3. Banerjee G., Ray A. Impact of microbial proteases on biotechnological industries // Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. 2017. Vol. 33. № 2. P. 119-143.
4. Thebti W., Riahi Y., Gharsalli R. et al. Screening and characterization of thermo-active enzymes of biotechnological interest produced by thermophilic *Bacillus* isolated from hot springs in Tunisia // Acta Biochimica Polonica. 2016. Vol. 63. № 3. P. 581–587.
5. Wang, Y., Cao, W., Luo, J. et al. Exploring the potential of lactic acid production from lignocellulosic hydrolysates with various ratios of hexose versus pentose by *Bacillus coagulans* IPE22 // Bioresource Technology. 2015.
6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes // edited by Vos, P., Garrity, G., Jones, D. et al. Springer Science & Business Media. New York. 2009. 1450 p.