

УДК 579.152.3

ФЕРМЕНТАТИВНА АКТИВНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* УКМ В-5139 И УКМ В-5140

**© 2011 г. Л. В. Авдеева, А. И. Осадчая,
М. А. Хархота, Е. Е. Борецкая**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)*

Изучена ферментативная активность штаммов *Bacillus subtilis* УКМ В-5139 и УКМ В-5140, входящих в состав пробиотика эндоспорина. Показано, что наряду с аминокислотами и рядом антимикробных веществ исследуемые штаммы синтезируют комплекс ферментов с целлюлолитической, ксиланазной, пекто- и липолитической активностями. Установлено, что по уровню ферментативной активности исследуемые штаммы превосходят немецкий биопрепарат БиоПлюс2Б, созданный на основе штаммов *B. subtilis* СН 201, *B. licheniformis* СН 200, в 22,0-33,4 раза по эндоглюканазе, в 19,6-20,9 раза по целлобиазе, в 11,2-14,2 раза по ксиланазе. В отличие от штаммов, входящих в состав БиоПлюс2Б, культуры *B. subtilis* УКМ В-5139 и УКМ В-5140 способны продуцировать пектинэстеразу. Обсуждается возможность использования штаммов *B. subtilis* УКМ В-5139 и УКМ В-5140 в качестве многофункциональной кормовой добавки в животноводстве и птицеводстве.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, экстрацеллюлярные гидролитические ферменты, кормовая добавка

Аэробные спорообразующие бактерии обладают рядом полезных свойств, которые далеко не полностью изучены. Так, способность к синтезу некоторыми штаммами бактерий рода *Bacillus* ряда антибиотических и других биологически активных веществ позволяет использовать эти бактерии как основу пробиотических препаратов (Бакулина и др., 2001). К таким относятся штаммы *B. subtilis* УКМ В-5139 и УКМ В-5140, входящие в состав пробиотика эндоспорина, созданного для лечения и профилактики послеродовых эндометритов, задержки последа у коров, коррекции дисбиотических состояний (Смирнов и др., 1999).

Авторами эндоспорина показано, что входящие в состав препарата культуры бацилл синтезируют до 19 свободных внеклеточных аминокислот, в том числе незаменимые, актив-

но продуцируют внеклеточные экзополисахариды и ферменты с высокой литической активностью, которые усиливают антагонистическую активность пробиотических штаммов и комплексное лечебно-профилактическое действие созданного на их основе препарата (Кудрявцев и др., 2004). Имеются сообщения, что введение в рацион свиней биомассы клеток пробиотических штаммов *B. subtilis*, но без метаболитов, приводит к уменьшению эффекта по сравнению с использованием их совместно со всеми метаболитами (Сапего, Берник, 2002).

Весьма перспективным является также использование бацилл в кормовых добавках в качестве источника ферментов (Сапего, Берник, 2002). В настоящее время в животноводстве для повышения питательной ценности кормов применяются и ферментные препараты из бактерий рода *Bacillus*, такие как амилосубтилин, протосубтилин, протомезентерин, бацелл. Доказано их положительное влияние на пищеварение и обмен веществ у животных и птицы (Марченко и др., 2004; Преображенский, 2006).

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ

Применение ферментов в животноводстве позволило отказаться от кормовых антибиотиков, которые в странах ЕС запрещены.

Кроме того, во многих европейских странах в современном птицеводстве и животноводстве в качестве альтернативы кормовым антибиотикам и кормовым ферментам для улучшения конверсии кормов и повышения привесов молодняка уже используется биопрепарат БиоПлюс2Б, созданный на основе штаммов бактерий рода *Bacillus*, производимый немецкой фирмой "Биохем ЛТД" (Марченко и др., 2004; Преображенский, 2006).

Некоторые исследователи рассматривают бактерии рода *Bacillus* еще и в роли пребиотиков, исходя из того, что клеточные стенки бактерий состоят из пептидогликана, дисахариды которого, соединенные β -глюкозидной связью, представляют собой структурные единицы практически всех пребиотиков (Преображенский, 2006). Последние способствуют восстановлению количественного и качественного состава нормальной микрофлоры кишечника и повышению эффективности пробиотиков.

Микробная конверсия материалов с высоким содержанием целлюлозы, гемицеллюлозы и других высокоструктурных соединений из-за отсутствия в организме животных необходимых для их разложения ферментов, продолжает оставаться одним из важнейших направлений в биотехнологии. В связи с этим бактерии рода *Bacillus* являются перспективной группой для поиска продуцентов экологически безопасных ферментов с широким спектром субстратной специфичности.

Целью настоящей работы явилось определить способность штаммов *B. subtilis* УКМ В-5139 и УКМ В-5140 синтезировать комплекс гидролитических ферментов с широкой субстратной специфичностью.

МЕТОДИКА

В работе использованы штаммы *B. subtilis* УКМ В-5139 и УКМ В-5140, составляющие основу препарата – пробиотика эндоспорина (Смирнов и др., 1999), а также штаммы *B. subtilis* СН 201, *B. licheniformis* СН 200, входящие в препарат БиоПлюс2Б.

Выращивание бактерий проводили на жидкой питательной среде, ранее оптимизированной для глубинного культивирования бацилл, хорошо обеспечивающей их рост и накопление биомассы клеток (Осадчая и др.,

1997). Состав среды (в г/л): натрия 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, pH $7 \pm 0,2$. Культивирование проводили в течение двух суток при 37°C в колбах емкостью 750 мл с 50 мл среды на шейкере (200 об./мин). Эта среда с внесением 0,5% кукурузного экстракта в качестве индуктора была взята нами для синтеза ферментов бактериями рода *Bacillus* с добавлением соответствующего специфического для каждого из ферментов субстрата (%). Для получения ксиланазы добавляли ксилан (1,0); эндоглюканызы – натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) (0,5); β -глюкозидазы – целлобиозу (0,2); пектиназ – пектин (0,5); липазы – оливковое масло (0,5). После выращивания бактерий отделяли культуральную жидкость от биомассы и определяли ферментативные активности в супернатантах.

Активность целлюлазы и целлобиазы в них оценивали по способности гидролизовать Na-КМЦ или целлобиозу в 0,05 М цитратно-фосфатном буфере (pH 5,0) соответственно по содержанию восстанавливающих сахаров. Их определяли с использованием динитросалициловой кислоты по предварительно построенным калибровочным кривым по глюкозе (Рухлядева, Польшгалына, 1981).

Активность ксиланазы определяли аналогично по количеству образовавшейся редуцирующей ксилозы при гидролизе ксилана в 0,05 М цитратно-фосфатном буфере (pH 5,0) титриметрическим методом, основанным на окислении сахара жидкостью Феллинга (Рухлядева, Польшгалына, 1981).

Активность пектинэстеразы (ПЭ) определяли титриметрическим методом на яблочном пектине (фирма Fluka), полигалактуроназы (ПГА) – по нарастанию количества альдегидных групп на этом же субстрате (Унифицирование ..., 1967).

Липазную активность культуральной жидкости определяли титриметрическим методом с использованием в качестве субстрата 40% эмульсии оливкового масла в 2%-ном водном растворе поливинилового спирта (Ота, Yamata, 1966). Липазную активность выражали в микромолях олеиновой кислоты в 1 мл культуральной жидкости. Активность других ферментов выражали в международных единицах – ед./мл.

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с помощью компьютерной программы Microsoft Excel 2003. Для

оценки достоверности отличий сравниваемых выборок использовали t-критерий Стьюдента на 5 % уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований бактерий *B. subtilis* УКМ В-5139 и УКМ В-5140 по их способности синтезировать экстрацеллюлярные ферментные комплексы в сравнении с культурами *B. subtilis* СН 201 и *B. licheniformis* СН 200, составляющими немецкий препарат БиоПлюс 2Б (Марченко и др., 2004), приведены в таблице. Исследуемые штаммы бацилл обладали способностью активно расщеплять различные полисахариды и другие субстраты (На-КМЦ, целлюбиозу, ксилан, пектин, оливковое масло), служащие источником углерода, и выделять в среду комплекс разрушающих их ферментов (Осадчая и др., 2009а, 2009б).

По уровню ферментативной активности штаммы *B. subtilis* УКМ В-5139 и УКМ В-5140 не только не уступали бациллам, входящим в препарат БиоПлюс2Б, но даже превышали в 22,0 – 34,4 раза уровень эндоглюканазы, в 19,6 – 20,9 раз уровень β-глюкозидазы и в 11,2 – 14,2 раза – уровень ксиланазы (данные приводятся по средним значениям для штаммов, входящих в соответствующие сравниваемые препараты). Активность липазы и полигалактуроназы у обоих препаратов находилась на одном уровне. Кроме того, культуры эндоспорина в отличие от БиоПлюс2Б способны расщеплять пектин не только при помощи полигалактуроназы, но и с участием пектинэстеразы, отсутствующей у культур препарата БиоПлюс2Б. Все это свидетельствует в пользу того, что бактерии *B. subtilis* УКМ В-5139 и УКМ В-5140 обладают более активными пектолитическими ферментами и, несомненно, способны более

полно разрушать пектиновые вещества клеточных стенок растительного корма, а при использовании этих культур в корм животным будут способствовать снижению вязкости этих веществ в нем, а, следовательно, повышать его усваиваемость в целом. Кроме того, ранее было показано, что бактерии *B. subtilis* УКМ В-5139 и УКМ В-5140, как и бактерии, входящие в БиоПлюс2Б, активно синтезируют такие гидролитические ферменты как амилаза, протеаза и, это еще в большей степени может способствовать расщеплению ряда соединений корма (Сафронова и др., 2006).

Следует отметить, что синтез пробиотическими штаммами *B. subtilis* УКМ В-5139 и УКМ В-5140 комплекса ферментов, гидролизующих трудно разрушаемые растительные субстраты, очень важен, поскольку они в совокупности делают эти субстраты более доступными, более эффективными по своему действию. При совместном применении, например, целлюлаз и ксиланаз, из таких почти неиспользуемых отходов, как подсолнечная лузга, кукурузная кочерыжка и другие образуется значительно больше легкодоступных сахаров, чем при раздельном их применении (Родионова, Итомлинский, 1971).

Наряду с этим, следует учитывать и то, что применение ферментов в животноводстве не предусматривает обязательную степень очистки. Это удешевляет процесс получения и расширяет возможности и цели их применения. В виде нативных суспензий, полученных глубинным методом выращивания, исследуемые бактерии можно было бы с успехом использовать для повышения качества кормов.

Таким образом, штаммы *B. subtilis* УКМ В-5139 и УКМ В-5140, продуцируя широкий спектр биологически активных веществ, могут

Ферментативная активность бактерий рода *Bacillus*, входящих в состав эндоспорина и препарата БиоПлюс 2Б

Культура бактерий	Целлюлозный комплекс, ед./мл		Ксиланаза, ед./мл	Пектолитический комплекс, ед./мл		Липаза, ед./мл
	Эндоглюканаза	Целлюбиаза		ПЭ	ПГА	
<i>B. subtilis</i> УКМ В-5139	5850±41,0	1660±25,0	357,4±20,4	1,43±0,50	8,3±2,4	28,5±5,1
<i>B. subtilis</i> УКМ В-5140	3753±21,0	1765±15,1	281,5±15,1	0,43±0,15	8,7±1,5	28,4±1,7
<i>B. subtilis</i> СН 201	181,1±9,5	90,2±1,9	85,7±23,1	0	8,0±1,0	28,2±1,8
<i>B. licheniformis</i> СН 200	158,9±9,9	78,8±3,5	83,3±2,3	0	8,4±0,9	28,2±1,8

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ

найти применение не только в качестве пробиотика, но и использоваться как кормовые антибиотики и ферменты. Обладая комплексом синтезируемых целлюлозоразрушающих многокомпонентных гидролаз, эти бактерии смогут найти широкое применение при улучшении качества мало используемых в сельском хозяйстве грубых кормов, богатых трудно доступной клетчаткой и сопутствующими ей гемицеллюлозами и пектином (стебли злаковых, подсолнечный шрот, листовенная древесина и др.), превращая их в легко усваиваемые питательные вещества. Изучаемые культуры могут дополнять друг друга по спектру продуцируемых биологически активных веществ, способствуя более полному расщеплению белков, жиров и углеводов, нормализуя процесс пищеварения, видовой и количественный состав микрофлоры кишечника и, в конечном итоге, положительно влияя на здоровье и продуктивность животных.

ЛИТЕРАТУРА

- Бакулина Л.Ф., Тимофеев И.В., Перминова Н.Г. Пробиотики на основе спорообразующих штаммов рода *Vacillus* и их использование в ветеринарии // Биотехнология. – 2001. – № 2. – С. 48-56.
- Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А., Осадчая А.И. Аэробы рода *Vacillus* как источник продуцентов литических ферментов // Биотехнология. – 2004. – № 4. – С. 24-33.
- Марченко Ф., Сунгуров А., Башкиров О. Комплексный подход к применению кормового пробиотика БиоПлюс2Б в сочетании с антибиотикотерапией // Эффективное птахівництво та тваринництво. – 2004. – № 3. – С. 29-30.
- Осадчая А.И., Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А. и др. Стимуляция роста и спорообразования *Vacillus subtilis* оптимизацией углеродного питания при глубинном культивировании // Прикл. биохимия и микробиология. – 1997. – Т. 33, № 3. – С. 321-324.
- Осадчая А.И., Сафронова Л.А., Авдеева Л.В., Иляш В.М. Скрининг штаммов бактерий с высокой целлюлазной активностью // Микробиологічний журнал. – 2009. – № 5. – С. 41-48.
- Осадчая А.И., Сафронова Л.А., Авдеева Л.В., Иляш В.М. Способность бактерий рода *Vacillus* гидролизовать ксилан // Микробиологія і біотехнологія – 2009. – № 7. – С. 63-69.
- Преображенский Л.Н. Фармакодинамические основы и перспективы применения ферментных препаратов в животноводстве // Ветеринария с.-х. животных. – 2006. – № 1. – С. 71-75.
- Родионова Н.А., Итомлинский И.В. Ксиланазная система и факторы, стимулирующие биосинтез ее компонентов // Микробиология и научно-технический прогресс: Тез. докл. 4 съезда Всесоюз. микробиол. общества. – Минск: Наука и техника, 1971. – С. 133-134.
- Рухлядева А.П., Польшгаллина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – 288 с.
- Сапего В.И., Берник Е.В. Биологически активные вещества и естественная резистентность телят // Ветеринария. – 2002. – № 5. – С. 44-46.
- Сафронова Л.А., Осадчая А.И., Иляш В.М., Мишак Е.В. Бактерии рода *Vacillus* – активные продуценты гидролитических ферментов // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. Біологія. – 2006. – Вип. 19. – С. 155-159.
- Смирнов В.В., Кудрявцев В.О., Осадчая А.И. та ін. Біопрепарат ендоспорин для лікування і профілактики ендометритів тварин. Пат. України 14569, А 61К 35/74, С 12 №1/20. Бюлетень № 6 від 11.10.99 р.
- Унифицирование методов определения активности ферментных препаратов производственного назначения. – Киев: УкрНИИНТИ, 1967.
- Ota V., Yamada Y. Lipase from *Candida haralipolytica* // Agric. Biol. Lhem. – 1966. – V. 30, № 4. – P. 351-358.

Поступила в редакцию
01.09.2010 г.

АВДЕЕВА и др.

**ENZYMATIC ACTIVITY OF *BACILLUS SUBTILIS*
УКМ В-5139 AND УКМ В-5140 STRAINS**

L. V. Avdeeva, A. I. Osadcha, M. A. Kharkhota, K. Ye. Boretska

*D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology
of National Academy of Science of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

The enzymatic activity of *Bacillus subtilis* УКМ В-5139 and УКМ В-5140 strains, that are the main components of endosporin, have been studied. There have been shown that the researcher strains synthesize the amino acids, antimicrobial compounds and complex of enzymes with cellulolytic, xylanolytic, pectolytic and lipolytic activities. It was established that the investigated strains surpass the by the level of enzymatic activity German biological preparation BioPlus2B generated on the basis of *Bacillus subtilis* CH 201 and *Bacillus licheniformis* CH 200 strains in 22,0-33,4 times by endoglucanase, in 19,6-20,9 times by celobiase, in 11,2-14,2 times by xylanase. Unlike the strains entering into the composition BioPlus2B, the strains *Bacillus subtilis* УКМ В-5139 and УКМ В-5140 are capable to produce a pectinesterase. The possibility of use of *Bacillus subtilis* УКМ В-5139 and УКМ В-5140 strains as the multipurpose fodder additive in animal husbandries and poultry farming is discussed.

Key words: *Bacillus subtilis*, hydrolytic enzymes, fodder additive

**ФЕРМЕНТАТИВНА АКТИВНІСТЬ
ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ *BACILLUS SUBTILIS*
УКМ В-5139 ТА УКМ В-5140**

Л. В. Авдєєва, А. І. Осадча, М. А. Хархота, К. Є. Борецька

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
Національної академії наук України
(Київ, Україна)*

Вивчено ферментативну активність штамів *Bacillus subtilis* УКМ В-5139 і УКМ В-5140, що входять до складу пробіотика ендоспорину. Показано, що поряд з амінокислотами і антимікробними речовинами досліджувані штами синтезують комплекс ферментів з целюлолітичною, ксиланазною, пекто- і ліполітичною активностями. Встановлено, що за рівнем ферментативної активності досліджувані штами перевершують німецький біопрепарат БиоПлюс2Б, створений на основі штамів *B. subtilis* CH 201, *B. licheniformis* CH 200, в 22,0-33,4 раза за ендоглюканазою, в 19,6-20,9 раза за целобіазою, в 11,2-14,2 раза за ксиланазою. На відміну від штамів, що входять до складу БиоПлюс2Б, культури *B. subtilis* УКМ В-5139 і УКМ В-5140 здатні продукувати пектинестеразу. Обговорюється можливість використання штамів *B. subtilis* УКМ В-5139 і УКМ В-5140 як багатофункціональної кормової добавки в тваринництві та птахівництві.

Ключові слова: *Bacillus subtilis*, екстрацелюлярні гідролітичні ферменти, кормова добавка