

БИОСИНТЕЗ ЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В КУЛЬТУРЕ
BACILLUS SUBTILIS

О. В. КИСЛУХИНА, К. А. КАЛУНЯНЦ, Б. А. МАРГАРЯН, Т. А. КУЗНЕЦОВА

Искусственное обеднение среды достигалось разбавлением культуральной жидкости на стадии активного синтеза литических ферментов компонентами, не содержащими органических соединений углерода и азота. При разбавлении культуральной жидкости этими компонентами в 1,75—2,5 раза получено увеличение выхода литических ферментов на 60—70%. Для активации биосинтеза литических ферментов могут быть применены регуляторы автолиза, снижающие интенсивность автолиза клеток продуцента литических ферментов. В качестве регуляторов автолиза использовались препараты фракции тейхоевых кислот микроорганизмов.

Ключевые слова: автолиз, лизис, ферменты.

Литические ферменты находят применение в различных процессах, связанных с разрушением клеток микроорганизмов или повышением проницаемости микробных клеточных стенок. Они используются в микробиологической промышленности при получении лизатов микробной биомассы и в медицине как средство борьбы с патогенными микроорганизмами. В последние годы значительно расширился круг исследований, посвященных этим ферментам. Наряду с изучением классического объекта—лизоцима животных—проводятся обширные исследования литических ферментов микроорганизмов.

К числу активных продуцентов литических ферментов относятся бактерии вида *Bac. subtilis*. Наши исследования показали, что ферментные препараты, выделенные из культуры различных штаммов *Bac. subtilis*, способны лизировать клетки грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей и высших грибов [1, 2, 4, 6]. Ферменты, продуцируемые штаммами *Bac. subtilis* 402 и 797, относятся к группе литических протеаз [1, 2]. Были определены оптимальные условия культивирования этих продуцентов в режиме одностадийного периодического процесса. В настоящей статье приводятся результаты, полученные при культивировании продуцента литических ферментов в режиме двухстадийного периодического процесса с использованием искусственного обеднения питательной среды и стабилизации клеток продуцента с помощью регуляторов автолиза.

Материал и методика. В качестве продуцента литических ферментов использовали штамм *Bac. subtilis* 402 (ЦМПМ-В-1611). Глубинную культуру продуцента выращивали в колбах на качалке, питательная среда содержала (в %): $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ —

0,4, KCl—0,06, CaCl₂—0,01, MgSO₄·7H₂O—0,01, органические источники питания—2 при pH 7—7,2. Продолжительность культивирования 16—18 ч при температуре 37°.

Препараты регуляторов автолиза выделяли следующим образом. К 100 мл суспензии биомассы микроорганизма, содержащей 5—10% сухих веществ, добавляли 10 мг кристаллического яичного лизоцима, лизис вели при постоянном перемешивании и температуре 40° в течение часа, затем вносили 10 мг кристаллического трипсина и продолжали процесс еще час в тех же условиях. К полученному ферментолизату биомассы добавляли 20 мл 30%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (конечная концентрация ТХУ 5%), экстрагировали кислоторастворимую фракцию в течение 3 ч при температуре 40—45° и перемешивали, после чего экстракт отделяли центрифугированием и охлаждали. К охлажденному экстракту добавляли 5 объемов изопропанола или ацетона, выпавший осадок отделяли центрифугированием, дважды промывали органическим растворителем, затем растворяли в воде, нейтрализовали слабым раствором NaOH и лиофилизировали.

Активность литических ферментов определяли турбидиметрическим методом по действию на клетки *E. coli* K12 [3]. За единицу активности принято количество фермента, которое вызывает снижение оптической плотности стандартной водной суспензии бактериальных клеток со скоростью 0,001 ед. оптической плотности в минуту при температуре 30°.

Интенсивность автолиза бактерий определяли путем измерения оптической плотности суспензии клеток до и после инкубации в течение часа при температуре 37°. Суспензию клеток приготавливали путем размешивания биомассы в воде на магнитной мешалке в течение 30—40 мин с последующей фильтрацией через слой ваты для отделения крупных частиц. Оптическую плотность измеряли на ФЭК-56М при длине волны 540 нм в кювете толщиной 5 мм. При определении влияния регуляторов на интенсивность автолиза реакционная смесь содержала в контроле 4 мл суспензии бактериальных клеток и 4 мл воды, в опытных вариантах—4 мл суспензии клеток и 4 мл водного раствора регулятора автолиза различной концентрации. При определении интенсивности автолиза клеток глубинной культуры *Bac. subtilis* реакционная смесь состояла из 4 мл суспензии клеток и 4 мл 0,02 М фосфатного буфера pH 7,8. Во всех случаях исходная оптическая плотность реакционной смеси—около 0,5. Интенсивность автолиза

$$I = \frac{D_0 - D_{60}}{D_0} 10\%, \text{ где}$$

D_0 —исходная оптическая плотность реакционной смеси, D_{60} —то же по истечении времени инкубации.

Результаты и обсуждение. Биосинтез внеклеточных литических ферментов является одним из приспособительных механизмов, способствующих выживанию микроорганизмов в естественных биоценозах. Микроорганизмы, продуцирующие внеклеточные литические ферменты широкого спектра действия, получают преимущество в конкурентной борьбе за источники питания, которая особенно обостряется на бедных питательных средах. В этих условиях продуцент литических ферментов может сохранить популяцию, используя в качестве органических источников питания продукты ферментативного расщепления клеток инородных микроорганизмов [5]. Биологическая целесообразность биосинтеза литических ферментов на бедных питательных средах позволяет предположить, что обеднение питательной среды по источникам органических соединений может служить стимулирующим фактором биосинтеза литических ферментов. Исходя из этого предположения, мы исследовали влияние искусственного обеднения питательной среды на выход литических ферментов при глубинном культивировании *Bac.*

subtilis. Искусственное обеднение среды проводили в конце ферментации. Выращивание продуцента на изначально обедненной среде считали нецелесообразным, так как это привело бы к снижению величины популяции.

Культуру выращивали на основной питательной среде в течение 14 ч, затем в культуральную жидкость вносили стерильную водопроводную воду или солевые растворы и продолжали культивирование еще 2 ч. Использовали следующие солевые растворы: $\text{CaCl}_2 + \text{MgSO}_4$, $\text{KCl} + (\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$, полный солевой состав основной среды. Соли содержались в растворах в тех же концентрациях, что и в основной питательной среде, за исключением фосфата аммония, концентрация которого была снижена вдвое.

Предварительные опыты показали, что при введении в культуральную жидкость воды или солевых растворов в количестве 0,5 объемов по отношению к исходному объему питательной среды выход литических ферментов повышается примерно в 1,5 раза и практически не зависит от состава разбавляющего раствора.

Было исследовано влияние степени разбавления культуральной жидкости на выход литических ферментов. Результаты табл. 1 показывают, что максимальный эффект от введения воды достигается в случае разбавления в 1,75 раза и составляет 62%. При разбавлении культуральной жидкости полным солевым составом оптимален вариант разбавления в 2,5 раза, при этом суммарная активность синтезированных литических ферментов повышается на 72%.

Таблица 1
Влияние разбавления культуральной жидкости на биосинтез литических ферментов в культуре *Bac. subtilis*

Состав разбавляющей среды	Кратность разбавления	Литическая активность, ед./мл	Выход литической активности, % к контролю
—	—	13200	100
Водопроводная вода	1,5	12400	141
	1,75	12200	162
	2	9100	138
Полный солевой состав среды	2	9630	146
	2,25	9150	156
	2,5	9100	172
	2,75	6770	141

Таким образом, искусственное обеднение питательной среды на стадии активного синтеза литических ферментов даст возможность повысить их выход практически без затрат на источники питания. Полученные результаты подтверждают предположение о том, что истощение запасов источников органических соединений в среде является индуцирующим фактором биосинтеза литических ферментов.

При обеднении питательной среды по источникам органических соединений углерода и азота снижается осмотическое давление среды. Известно, что осмотическое давление является фактором, стабилизи-

рующим клеточные структуры. При снижении его активируются литические процессы, снижается продолжительность продуктивного состояния микробных клеток. Это уменьшает положительный эффект обеднения питательной среды, связанный с индукцией синтеза литических ферментов. Для повышения положительного эффекта разбавления культуральной жидкости в нее одновременно с разбавляющими компонентами должны вводиться компоненты, препятствующие развитию автолитических процессов в клетках продуцента.

В качестве таких компонентов нами были использованы регуляторы автолиза бактерий—фракция тейхоевых кислот микроорганизмов. Исследование действия регуляторов на интенсивность автолиза *Bac. subtilis* шт. 402 показало, что препараты, выделенные из различных источников, могут повышать или понижать интенсивность автолиза и различаются по силе воздействия. Для стабилизации клеток продуцента литических ферментов необходимо было выбрать регуляторы, понижающие интенсивность автолиза и обладающие высокой эффективностью действия. С этой целью была определена зависимость интенсивности автолиза клеток шт. 402 от концентрации регуляторов и на основании полученных данных вычислены концентрации регуляторов из различных источников, необходимые для снижения интенсивности автолиза вдвое (табл. 2). Наиболее специфичным из испытанных ока-

Т а б л и ц а 2
Концентрации регуляторов автолиза, необходимые для снижения интенсивности автолиза *Bac. subtilis* шт. 402 на 50%

Источник регулятора	Концентрация регулятора, мг/мл
<i>Bacillus mesentericus</i> 1	0,086
<i>Bacillus subtilis</i> 402	0,33
<i>Bac. mesentericus</i> 69	0,43
<i>Bac. mesentericus</i> 346	0,44
<i>Bac. subtilis</i> Г—43	0,57
<i>Bac. subtilis</i> Ф	0,9
<i>Bacillus licheniformis</i>	1
<i>Bac. mesentericus</i> ПВ	более 1
<i>Bac. subtilis</i> R—623	
<i>Candida guilliermondii</i>	
<i>Bac. subtilis</i> 72	
<i>Bac. subtilis</i> 797	

зался препарат регулятора из *Bac. mesentericus* 1, высокой эффективностью обладал также регулятор из *Bac. subtilis* шт. 402. С точки зрения физиологии больший интерес представлял регулятор из культуры продуцента литических ферментов, и он был использован в опытах по влиянию регулятора автолиза на биосинтез литических ферментов.

Необходимо было определить момент введения регулятора. Для этого была исследована динамика интенсивности автолиза клеток продуцента и литической активности культуральной жидкости. Результаты, приведенные на рис., показывают, что в данной серии опытов максимум интенсивности автолиза и литической активности культуральной жидкости наблюдался в 18—20-часовой культуре. Для введения

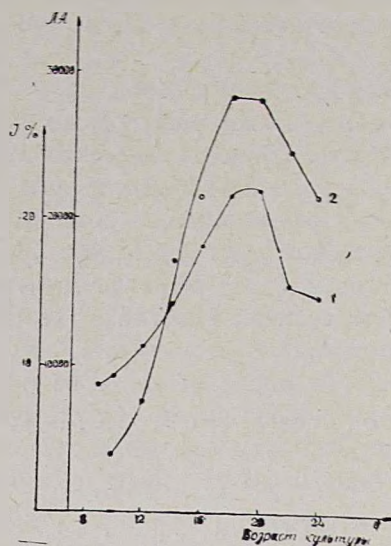


Рис. Зависимость интенсивности автолиза клеток продуцента и литической активности культуральной жидкости от возраста глубинной культуры *Bac. subtilis*. 1—интенсивность автолиза, 2—литическая активность

регулятора был выбран возраст культуры 14 ч, когда интенсивность автолиза составляет 70% от максимальной. После введения регулятора культивирование продолжали 4 ч, то есть до возраста культуры 18 ч.

Оптимальная концентрация регулятора автолиза, определенная при внесении его в малом объеме (0,12 объема исходной среды), составила 0,75 мг/мл (табл. 3). При этом было получено увеличение вы-

Таблица 3
Влияние регулятора автолиза из *Bac. subtilis* шт. 402 на биосинтез литических ферментов в культуре того же штамма

Добавляемые компоненты и их количество		Литическая активность	
вода, объемы	регулятор автолиза, мг/мл исходного объема среды	ед/мл	выход, % к контролю
—	—	13200	100
0,12*	0,25	13100	111
0,12	0,5	13200	112
0,12	0,75	15900	135
0,12	1	15700	133
1	0	9840	149
1	0,75	11900	180

* Объем водного раствора регулятора автолиза.

хода литических ферментов на 35%. При внесении того же количества регулятора автолиза на фоне двукратного разбавления культуральной жидкости водой эффект составил 80% по отношению к контролю, или 31% относительно варианта с разбавлением водой без регулятора. Таким образом, абсолютная величина эффекта от внесения регулятора была в обоих случаях одинаковой. Полученные результаты подтвердили предположение о том, что введение регулятора, снижающего интенсивность автолиза клеток продуцента литических ферментов, может повысить уровень биосинтеза этих ферментов.

Нами впервые был использован специфический регулятор автолиза для стимуляции биосинтеза внеклеточных метаболитов бактерий. В настоящее время в практике микробиологической промышленности для этих целей применяются неспецифические способы регуляции. Так, для стабилизации автолизирующихся клеток продуцентов амилазы и протеазы используется осмотическое давление, создаваемое высокими концентрациями органических компонентов питательной среды. В ферментации продуцентов аминокислот, где возникает необходимость повысить проницаемость клеточных стенок бактерий, в среду вводят поверхностно-активные вещества или антибиотики. Тот же эффект может быть достигнут путем введения специфических регуляторов, повышающих интенсивность автолиза клеток продуцентов аминокислот.

Общность механизма автолитических процессов у бактерий позволяет предполагать, что специфические регуляторы автолиза найдут широкое применение в процессах микробиологического синтеза целевых продуктов. Это даст возможность избежать нежелательных побочных явлений, вызываемых применением неспецифических способов регуляции автолиза.

ВНИИ биотехники, Москва, Институт микробиологии
АН Армянской ССР

Поступило 15.IX 1980 г.

ԼԻՏԻԿ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԲԻՈՍԻՆԹԵԶԸ BACILLUS SUBTILIS ԿՈՒՆՏՐՈՅՈՒՄ

Ս. Վ. ԿԻՍԼՈՒԽԻՆԱ, Կ. Ա. ԿԱԼՈՒՆՅԱՆՑ, Բ. Ա. ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ, Տ. Ա. ԿՈՒԶՆԵՅՈՎԱ

Հոգվածում քննվում են լիտիկ ֆերմենտների բիոսինթեզը կարգավորող հզանակները:

Ցույց է տրված, որ իբրև բիոսինթեզի խթանիչ գործոն հանդես է գալիս օրգանական միացությունների պաշարի ապառումը: Դա գործնականորեն հնարավորություն է տալիս բարձրացնելու նրանց ելքը՝ առանց սննդի աղբյուրների ծախսման: Արտաբջջային լիտիկ ֆերմենտների բիոսինթեզը խթանելու համար օգտագործված է նաև յուրահատուկ կարգավորիչ, որն առանձնացված է *Bac. subtilis* 402 շտամից:

STUDY OF BIOSYNTHESIS OF LYTIC ENZYMES IN *BACILLUS SUBTILIS* CULTURE

O. V. KISLUKHINA, K. A. KALUNIANTS, B. A. MARKARIAN,
T. A. KUZNETSOVA

The ways of regulation of biosynthesis of lytic enzymes are discussed. The exhaustion of sources of organic compounds in the environment is the factor which induces biosynthesis of lytic enzymes making it possible to increase their output without any expenditure on the sources of nourishment. The specific regulator of autolysis, which has been also used for stimulation of biosynthesis of extracellular lytic enzymes, is the fraction of teichoic acid from *Bac. subtilis* 402.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аксеновская В. Е., Кислухина О. В., Калунянц К. А. Ферментная и спиртовая промышленность, 7, 20, 1979.
2. Бизюлявичюс Г. С., Кислухина О. В., Авиженис В. Ю. Тр. ВНИИ прикладной энзимологии. Вып. 3. Производство и применение микробных ферментных препаратов. Вильнюс, 105, 1976.
3. Кислухина О. В. Микробиол. промышленность, 10, 43, 1976.
4. Кислухина О. В., Бизюлявичюс Г. С. Прикладная биохимия и микробиология, 13, 55, 1977.
5. Кислухина О. В., Калунянц К. А. Микробиол. промышленность, 9, 23, 1977.
6. Кислухина О. В., Кузнецова Т. А., Аксеновская В. Е. Микробиол. промышленность, 4, 2, 1979.