

Бактерии рода *Bacillus* как перспективные продуценты протеолитических ферментов

Е.А. Царева

Самарский государственный технический университет, Самара, Россия

Обоснование. В настоящее время протеазы используются во многих областях промышленности: в фармацевтической, пищевой, а также в медицине. Около 60 % коммерчески доступных ферментов производится бактериями рода *Bacillus*, чаще всего видом *Bacillus subtilis*. Также бактерии *Bacillus* обладают высокой приспособляемостью к различным условиям [1]. Разработка технологии получения ферментных препаратов важна с точки зрения обеспечения продовольственной безопасности и независимости государства. Поэтому исследования в данном направлении являются актуальными и практически значимыми.

Цель — изучить возможность использования бактерий *Bacillus subtilis* в качестве продуцента протеолитических ферментов.

Методы. В качестве объекта исследования использовали клетки бактерий *Bacillus subtilis*. Штамм был получен в коллекции культур ВКПМ [2]. На первом этапе работы микроорганизмы оживляли в жидкой питательной среде L, а затем пересеивали на скошенный агар. Состав питательной среды L (г/л): пептон — 15; дрожжевой экстракт — 15; NaCl — 5; агар микробиологический — 15.

Для учета биомассы использовали гравиметрический метод и оценку по мутности клеточной суспензии с использованием спектрофотометра. Для большей точности методы объединили и построили градуировку по биомассе. Определяли оптическую плотность разведений клеточной суспензии и концентрацию биомассы, полученную весовым методом, а затем по этим значениям строили градуировочный график. Для построения графика использовали диапазон с оптической плотностью от 0,1 до 1, так как для этого диапазона сохраняется линейность закона Бугера–Ламберта–Бера [3]. Полученные результаты представлены на рис. 1.

Для обработки данных использовали программу машинного обучения Weka и модель линейной регрессии, для проверки использовали метод K-блочной кросс-валидации.

Для определения активности протеаз выбрали метод, основанный на интенсивности окрашивания тирозина, отщепляющегося от белка в процессе гидролиза протеазами. За основу методики брали модификацию ГОСТ 34430-2018 «Метод определения протеолитической активности», в качестве субстрата использовали раствор альбумина бычьего сывороточного [4].

На рис. 2 представлена кривая роста концентрации клеток и активности фермента. Измерения проводили каждые 12 часов в течение 5 суток.

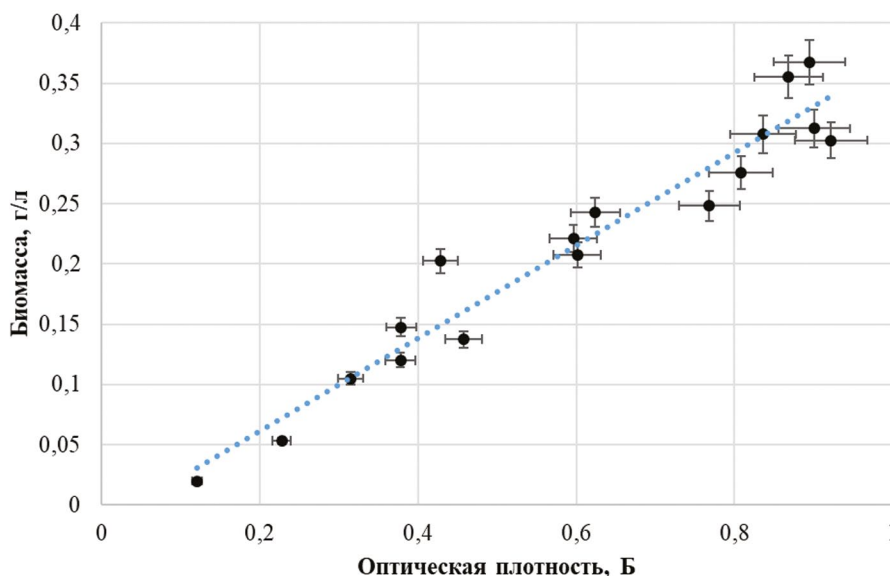


Рис. 1. График для определения концентрации биомассы по оптической плотности клеточной суспензии

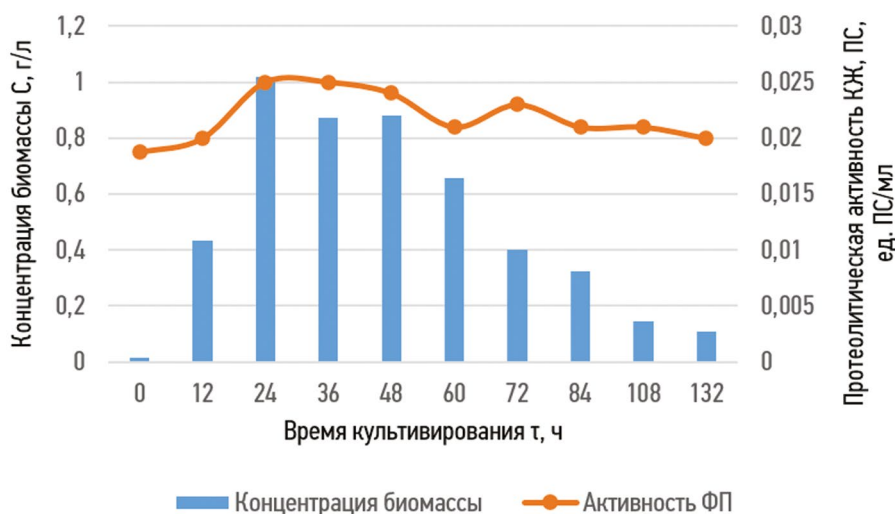


Рис. 2. Зависимость концентрации биомассы клеток бактерий и протеолитической активности культуральной жидкости от времени культивирования

Также исследовали характер роста биомассы и протеолитической активности фермента на питательных средах, содержащих соли аммония: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и цитрат аммония — $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$. Затем провели культивирование бактерий в шейкере-инкубаторе при 37 °C и 160 об/мин на питательной среде с использованием органического источника азота — пептона. Спустя сутки клеточную суспензию центрифугировали для отделения культуральной жидкости с ферментом и после ее выпарили на ротационно-вакуумном испарителе для удаления воды и сушки фермента. В полученном сухом ферменте определили активность и сравнили с активностью промышленно выпускаемых ферментов.

Результаты. Получена модель зависимости концентрации биомассы от оптической плотности клеточной суспензии. Коэффициент корреляции для полученной модели составляет 96 %, а значение средней абсолютной ошибки — 2 %. Максимальный прирост биомассы и ферментативная активность наблюдались через 24 ч после начала культивирования. Прирост биомассы на среде L с пептоном ниже, но значение протеолитической активности выше, а на средах с солями аммония, наоборот, значение ферментативной активности уменьшается, так как бактерии в первую очередь усваивают неорганические источники азота и необходимость в биосинтезе протеаз отсутствует.

Выводы. В ходе работы был разработан метод контроля концентрации клеток по оптической плотности культуральной жидкости; отработана методика определения протеолитической активности. Также был получен сухой ферментный препарат, обладающий уровнем активности, сопоставимым с промышленными аналогами.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*; учет биомассы; протеазы; протосубтилин; машинное обучение.

Список литературы

1. Beranova J., Mansilla M.C., de Mendoza D., Elhottova D., Konopasek I. Differences in Cold Adaptation of *Bacillus subtilis* under Anaerobic and Aerobic Conditions // Journal of Bacteriology. 2010. Vol. 192, N 16. P. 4164–4171. doi: 10.1128/JB.00384-10 EDN: NZMBET
2. vkpm.genetika.ru [Электронный ресурс] Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт». Режим доступа: <https://vkpm.genetika.ru/katalog-mikroorganizmov/show21097/> Дата обращения: 19.05.2025.
3. Брель А.К., Василькова Е.А., Ниязов Л.Н., Хайдаров А.А., Ахмедов В.Н. Спектральные методы анализа органических соединений. Бухара: Durdona, 2019. 105 с.
4. ГОСТ 34430-2018. Ферментные препараты для пищевой промышленности. Метод определения протеолитической активности. Введ. 2019-07-01. Москва: Стандартинформ, 2018. 12 с.

Сведения об авторе:

Елена Алексеевна Царева — студентка, группа 2-ВБШ-23ВБШ-101М, Высшая биотехнологическая школа; Самарский государственный технический университет, Самара, Россия. E-mail: elena.tsareva.978@mail.ru

Сведения о научном руководителе:

Владимир Валентинович Бахарев — доктор химических наук, доцент, профессор; Самарский государственный технический университет, Самара, Россия. E-mail: knilsstu@gmail.ru