

ГЛИКОЗИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЧЕРНОГО МОРЯ

*Е.В. Гудзенко¹, Н.В. Борзова¹, Л.Д. Варбанец¹,
В.А. Иваница², И.И. Сейфуллина², Е.Э. Марцинко²,
О.В. Пирожок², Е.А. Чебаненко²*

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,

ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

²Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,

ул. Дворянская, 2, Одесса, 65029, Украина

e-mail: ov_gudzenko@bigmir.net

Высокий биотехнологический потенциал морских микроорганизмов как продуцентов ферментов стимулировал в последние годы исследование их разнообразия и биологических особенностей, в том числе активный скрининг гликозидаз морских бактерий для коммерческого использования. **Целью** данной работы было изучить способность бактерий, выделенных из донных осадков Черного моря, продуцировать гликозидазы различной специфичности, а также исследовать возможность использования координационных соединений германия для повышения ферментативной активности бактерий рода *Bacillus*. **Методы.** Культивирование бактерий проводили в глубинных условиях, в качестве источников углерода использовали мальтозу и рамнозу. Гликозидазные активности определяли методом Romero и Davis, белок – методом Lowry. Координационные соединения германия в концентрациях 0,1 и 0,01 % были использованы как эффекторы биосинтеза и активности α -L-рамнозидазы. **Результаты.** На основании скрининга 12 гликозидазных активностей (β -D-галактозидазной, β -D-глюкуронидазной, α -D-маннозидазной, α -D-ксилозидазной, α -D-фукозидазной, β -D-ксилозидазной, β -D-глюкозидазной, N-ацетил- β -D-глюкозаминидазной, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазной, N-ацетил- β -D-галактозаминидазной, α -D-глюкозидазной, α -L-рамнозидазной) у 8 из 10 исследованных культур *Bacillus* была обнаружена только α -L-рамнозидазная активность (0,03–0,18 ед/мг белка). Наиболее активной была культура *Bacillus* sp. 19. Отмечено снижение α -L-рамнозидазной активности *Bacillus* sp. 19 при внесении комплексов германия (0,1 и 0,01%) в среду роста. Показано, что бис(бипиридин)хлоромедь(II) бис(цитрато)германат(IV)октагидрат и трис(бипиридин)никель(II) бис(цитрато)германат(IV)моногидрат могут быть использованы для повышения активности энзима *Bacillus* sp. 19. **Выводы.** Впервые показана α -L-рамнозидазная активность морских штаммов, представителей видов *Bacillus licheniformis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*. Отмечена активация α -L-рамнозидазы *Bacillus* sp. 19 координационными соединениями германия.

Ключевые слова: гликозидазы, α -L-рамнозидазная активность, бактерии Черного моря, *Bacillus*, скрининг, координационные соединения германия.

В последнее десятилетие значительно возросло количество работ по изучению морских микроорганизмов. Их характерной особенностью, помимо психро-, гало-, барофильности и толерантности, является также продукция уникальных вторичных метаболитов, в том числе комплексов ферментов, участвующих в процессах микробной модификации различных биополимеров [1–3]. Морская биота существенно отличается от

наземной, поэтому высока вероятность обнаружения в морской среде продуцентов ферментов, удовлетворяющих практическим потребностям современной биотехнологии. На сегодня среди морских микроорганизмов описаны продуценты разнообразных, в том числе и уникальных, гидролитических ферментов [4–6], особое место среди которых занимают гликозидазы, играющие важную роль как в обеспечении метаболических процессов микробной клетки, так и в деградации углеводсодержащих соединений окружающей среды. Показано [7–9], что морские бактерии способны синтезировать широкий спектр гликозидаз различной специфичности, а исследования структурных, функциональных и молекулярных особенностей микробных ферментов, полученных из новых источников, имеют огромное теоретическое и практическое значение.

Экскретируемые в окружающую среду гликозидазы микроорганизмов, как и ряд других ферментов [1, 3], являются индуцибельными. Они могут присутствовать в клетке в следовых количествах, однако их синтез может быть активирован различными веществами, как непосредственно субстратами, так и синтетическими веществами, ионами металлов и их комплексными соединениями. Среди последних перспективными и в то же время наименее изученными являются координационные соединения активных металлов, в частности германия, с биолигандами [10–12]. Уникальные комплексообразующие свойства германия находят применение в различных областях медицины и фармакологии, в том числе и благодаря способности влиять на свойства протеина путем изменения его конформации [12, 13].

Целью данной работы было изучить способность бактерий рода *Bacillus*, выделенных из донных осадков Черного моря, продуцировать гликозидазы различной специфичности, а также исследовать возможность использования координационных соединений германия для повышения ферментативной активности бактерий.

Материалы и методы. В работе были использованы микроорганизмы, полученные из коллекции живых культур кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии Одесского национального университета. Культуры микроорганизмов были выделены из проб донных осадков Черного моря.

Для скрининга гликозидаз бактерии выращивали на среде №1 следующего состава, г/л: KH_2PO_4 – 1,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,75; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; мальтоза – 10,0; дрожжевой автолизат – 0,5.

Культивирование для скрининга α -L-рамнозидазы проводили на двух средах: среда №2, г/л (KH_2PO_4 – 1,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,75; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; рамноза – 5,0; дрожжевой автолизат – 1,5); среда №3, г/л (пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 5,0; рамноза – 10,0).

Культивирование бактерий проводили в глубинных условиях в пробирках, содержащих 10 мл питательной среды, при 26°C и 42°C, скорости вращения качалки 220 об/мин на протяжении 4 суток. Для засева пробирок использовали бактериальную суспензию суточной культуры в концентрации 10^4 – 10^5 КОЕ/мл по стандарту мутности.

По окончании ферментации биомассу отделяли центрифугированием при 5000 g, 10 мин. Энзиматические активности определяли в супернатанте культуральной жидкости.

Место выделения штаммов

Номер штамма	№ станции	Горизонт керна осадков, см	Вид	Глубина на станции, м
A	233, возле Турции	20-25	<i>Bacillus</i> sp.	1537
1	233, возле Турции	30-35	<i>Bacillus licheniformis</i>	1537
8	233, возле Турции	10-15	<i>Bacillus</i> sp.	1537
213	233, возле Турции	5-10	<i>Bacillus</i> sp.	1537
33	242, возле Турции	25-30	<i>Bacillus</i> sp.	1499
249	242, возле Турции	15-20	<i>Bacillus licheniformis</i>	1499
251	242, возле Турции	15-20	<i>Bacillus subtilis</i>	1499
19	258, возле Крыма	5-10	<i>Bacillus</i> sp.	888
98	258, возле Крыма	0-5	<i>Bacillus</i> sp.	888
246	258, возле Крыма	10-15	<i>Bacillus atrophaus</i>	888

При определении активности гликозидаз в качестве субстратов использовали следующие нитрофенильные производные углеводов (“Sigma-Aldrich”, США): *n*-нитрофенил- β -D-галактопиранозид, *n*-нитрофенил- β -D-глюкуронид, *n*-нитрофенил- α -D-маннопиранозид, *n*-нитрофенил- α -D-ксилопиранозид, *n*-нитрофенил- α -D-фукопиранозид, *n*-нитрофенил- β -D-ксилопиранозид, *n*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид, *n*-нитрофенил-N-ацетил- β -D-глюкозаминид, *n*-нитрофенил-N-ацетил- α -D-глюкозаминид, *n*-нитрофенил-N-ацетил- β -D-галактозаминид, *n*-нитрофенил- α -D-глюкопиранозид, *n*-нитрофенил- α -L-рамнопиранозид.

Для определения гликозидазной активности к 0,1 мл супернатанта культуральной жидкости добавляли 0,2 мл 0,1 М фосфат-цитратного буфера (ФЦБ) pH 5,2 и 0,1 мл 0,01 М раствора соответствующего субстрата в ФЦБ. Реакционную смесь инкубировали в течение 10 мин при температуре 37°C. Реакцию останавливали добавлением 2 мл 1 М раствора бикарбоната натрия. К контрольной пробе добавляли те же компоненты, однако в обратном порядке. Количество *n*-нитрофенола, который образуется в результате гидролиза, определяли колориметрическим методом по поглощению при 400 нм [14]. За единицу активности фермента (ед.) принимали такое его количество, которое гидролизует 1 мкмоль соответствующего субстрата за 1 мин в условиях опыта.

α -L-Рамнозидазную активность также определяли по методу Davis [15], используя в качестве субстрата нарингин. За единицу активности энзима принимали такое его количество, которое гидролизует 1 мкмоль субстрата за 1 мин в условиях опыта. Реакционная смесь содержала 0,1 мл раствора энзима в 0,1 М фосфат-цитратном буфере (ФЦБ), pH 5,2, 0,1 мл 2,5 мМ раствора субстрата. Смесь инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 3 мл 4 М раствора NaOH. Через 30 мин измеряли интенсивность окрашивания реакционной смеси при длине волны 310 нм на спектрофотометре СФ-26. Удельную активность рассчитывали как количество единиц активности, отнесенное к 1 мг белка.

Концентрацию протеина в супернатанте культуральной жидкости определяли методом Lowry [16]. Калибровочную кривую строили с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина.

Для изучения влияния различных эффекторов на синтез α -L-рамнозидазы в среде роста № 3 вносили следующие соединения: фенантролиний бис(цитрато)германат(IV)тригидрат (1); бис(фенантролин)хлоромедь(II) бис(цитрато)германат(IV) гексагидрат (2); трис(фенантролин)железо(II) бис(цитрато)германат(IV) тетрагидрат (3); трис(фенантролин)железо(II) бис(цитрато)германат(IV) тетрагидрат (4); бипиридиний бис(цитрато)германат(IV) дигидрат (5); бис(бипиридин)хлоромедь(II) бис(цитрато)германат(IV) октагидрат (6); трис(бипиридин)никель(II) бис(цитрато)германат(IV) моногидрат (7); трис(бипиридин)железо(II) бис(цитрато)германат(IV) тетрагидрат (8) в концентрации 0,1 и 0,01%. Эти же концентрации использовали и в случае изучения действия указанных соединений на α -L-рамнозидазную активность супернатанта культуральной жидкости. Время экспозиции энзима с соединением составляло 60 мин при 20°C. Активность определяли согласно указанной выше методике.

Все эксперименты проводили не менее чем в 3–5 повторностях. Статистическую обработку результатов экспериментальных серий осуществляли стандартными методами с использованием *t*-критерия Стьюдента при 5 % уровне значимости.

Результаты. Изучение физиологии и особенностей метаболизма бактерий, выделенных из морской воды и донных отложений, в том числе и внеклеточной гликозидазной активности, представляет определенные трудности. Это связано, прежде всего, со сложностью воссоздания условий экониши, откуда были выделены микроорганизмы, в нашем случае – глубоководных донных осадков. Таким образом, культивирование бактерий в лабораторных условиях позволило лишь в малой мере оценить биологический потенциал изученных культур. Так, было показано, что все исследуемые штаммы на среде №1 не проявляли β -D-галактозидазную, β -D-глюкуронидазную, α -D-маннозидазную, α -D-ксилозидазную, α -D-фукозидазную, β -D-ксилозидазную, β -D-глюкозидазную, N-ацетил- β -D-глюкозаминидазную, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазную, N-ацетил- β -D-галактозаминидазную, α -D-глюкозидазную активности. В тоже время 3 из 10 исследованных штаммов проявили α -L-рамнозидазную активность на уровне 0,01 – 0,02 ед/мл при культивировании на среде №1, содержащей мальтозу в качестве источника углерода. При выращивании бактерий на средах, содержащих рамнозу, отмечали α -L-рамнозидазную активность уже у 8 штаммов (рис. 1). При этом на среде №3 активность была выше в среднем на 25 % по сравнению с выращиванием на среде №2. В супернатанте культуральной жидкости она составляла от 0,03 до 0,18 ед/мг белка. Наивысшую активность выявлено у штамма *Bacillus* sp. 19 (0,18 ед/мг белка). Было показано, что выращивание культур при 26°C обеспечивает более высокие показатели α -L-рамнозидазной активности, чем при 42°C (рис. 1). Можно отметить, что корреляции между местом выделения, видовой принадлежностью культуры, глубиной забора пробы и ферментативной активностью культуры не обнаружено. Это в целом соответствует современным представлениям о том, что гликозидазная активность микроорганизмов – это штаммовый, а не видовой признак [1, 4, 8].

Для определения α -L-рамнозидазной активности были использованы два субстрата: синтетический *p*-нитрофенил- α -L-рамнопиранозид и натуральный флавоноид нарингин. И хотя скорость гидролиза синтетического субстрата была выше, однако во всех случаях показана способность изученных α -L-рамнозидаз бацилл гидролизовать нарингин (рис. 1).

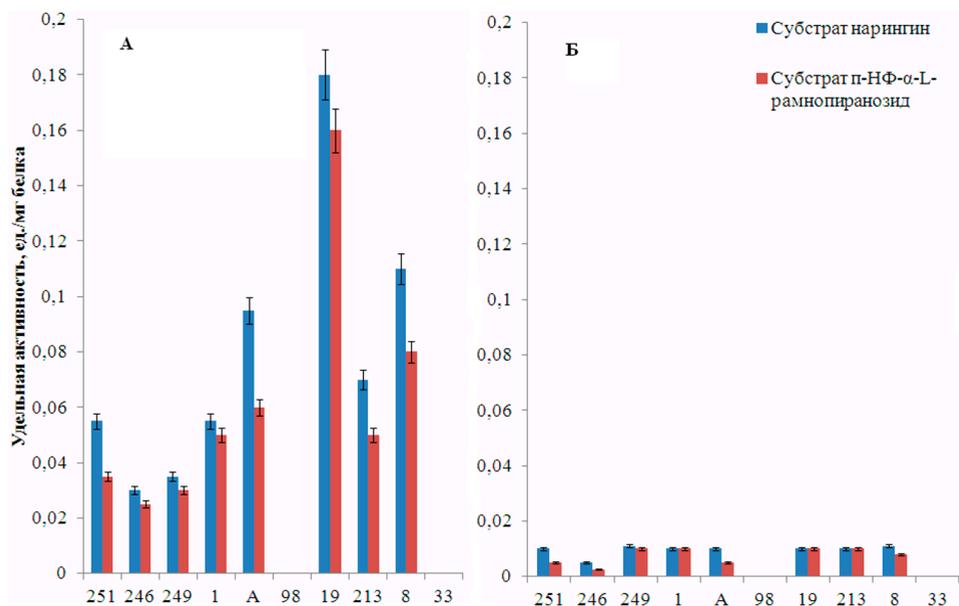


Рис. 1. α -L-Рамнозидазная активность исследованных штаммов *Bacillus*, температура выращивания культуры: А – 26°C, Б – 42°C

Поскольку штамм *Bacillus* sp. 19 проявил наивысшую α -L-рамнозидазную активность, он был использован для дальнейших исследований по индукции синтеза, а также стимуляции активности α -L-рамнозидазы координационными соединениями германия с различными биолигандами. Показано снижение α -L-рамнозидазной активности в процессе культивирования бактерий в присутствии всех использованных координационных соединений (рис. 2). Наибольшее угнетение активности (на 72%) наблюдали при добавлении в среду роста 0,1% соединения 4, тогда как при снижении его концентрации до 0,01% ингибирующий эффект снижался до 44%. Подобную динамику наблюдали и при изучении влияния соединений 2 и 3: 0,1% их концентрация в питательной среде в большей степени угнетала α -L-рамнозидазную активность, чем 0,01%. В целом следует отметить, что во всех случаях наблюдалось снижение α -L-рамнозидазной активности в культуральной жидкости бактерий в присутствии координационных соединений германия. Также концентрация белка в контрольной среде роста была выше в среднем на 25–35 % по сравнению с культуральной жидкостью в присутствии координационных соединений (рис. 2), то есть параллельно со снижением α -L-рамнозидазной активности наблюдалось угнетение роста культуры в целом.

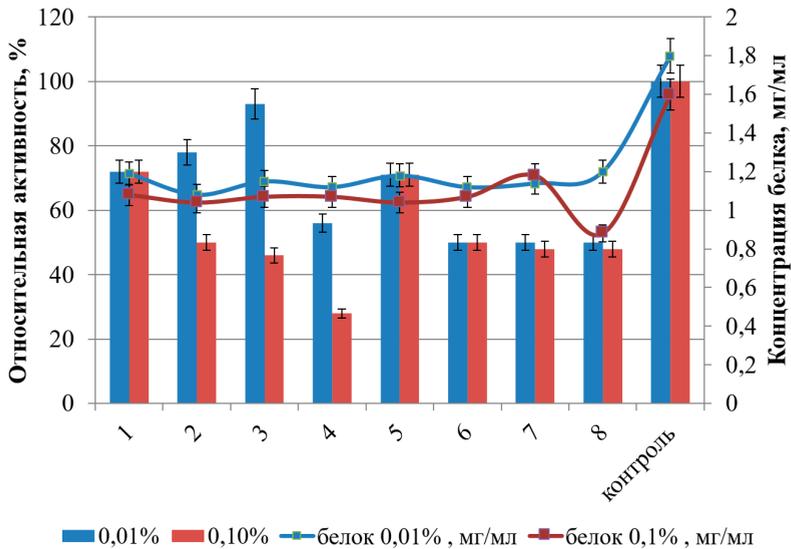


Рис. 2. Влияние соединений германия на α -L-рамнозидазную активность в супернатанте культуральной жидкости *Bacillus sp. 19*

Примечание: 1-фенантролиний бис(цитрато)германат(IV)тригидрат; 2-бис(фенантролин)хлоромедь(II) бис(цитрато)германат(IV)гексагидрат; 3-трис(фенантролин)железо(II) бис(цитрато)германат(IV)тетрагидрат; 4-трис(фенантролин)железо(II) бис(цитрато)германат(IV)тетрагидрат; 5-бипиридиний бис(цитрато)германат(IV)дигидрат; 6-бис(бипиридин)хлоромедь(II) бис(цитрато)германат(IV)октагидрат; 7-трис(бипиридин)никель(II) бис(цитрато)германат(IV)моногидрат; 8-трис(бипиридин)железо(II) бис(цитрато)германат(IV)тетрагидрат.

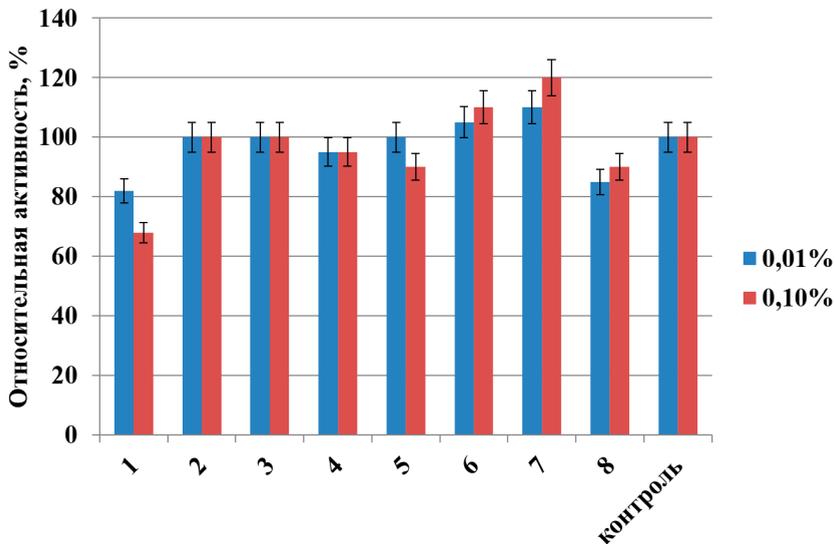


Рис. 3. Влияние ряда соединений германия на активность α -L-рамнозидазы *Bacillus sp. 19*

Поскольку эффект снижения ферментативной активности в присутствии комплексов германия в среде роста может быть связан как с ингибированием синтеза энзима, так и быть следствием взаимодействия с протеиновой молекулой, было проведено исследование влияния координационных соединений германия на α -L-рамнозидазную активность *Bacillus* sp. 19 (рис. 3). Существенное ингибирование каталитической активности (от 10 до 32% в зависимости от концентрации) наблюдалось в присутствии комплексов 1 и 8. Соединения 6 и 7 увеличивали активность на 5–20%. Влияние остальных соединений не выходило за пределы погрешности эксперимента.

Обсуждение. Способность продуцировать внутри- и внеклеточные гликозидазы позволяет рассматривать морские микроорганизмы в качестве агентов утилизации специфических органических полимеров водной среды, а также в качестве продуцентов ферментов с уникальными свойствами и специфичностью, которые могут быть востребованы в биотехнологиях переработки растительного сырья [2, 4]. При этом в литературе крайне мало информации о распределении активности гликозидаз среди различных видов, составляющих бактериальные сообщества морей и океанов [1, 6].

На сегодняшний день о специфических естественных факторах роста и развития бактерий в морской среде известно недостаточно. Обычные среды не могут в полной мере заменить морские источники питания для этих бактерий (сульфатированные полисахариды, морские протеины и т.п.). Поэтому только около 1% морских микроорганизмов растет в «стандартных» лабораторных условиях и может быть достаточно полно изучено. Нами была показана низкая биосинтетическая активность штаммов рода *Bacillus*, выделенных из проб донных осадков Черного моря, в отличие от морских бактерий рода *Bacteroidetes*, демонстрирующих широкий спектр гликозидазных активностей в культуральной жидкости [5, 7, 8]. Это может быть связано как с физиологическими особенностями данных культур, так и со сложностями методических подходов для их культивирования. В процессе исследования гликозидазных активностей бактерий рода *Bacillus* нами была обнаружена только внеклеточная α -L-рамнозидазная активность у 8 штаммов, относящихся к видам *Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus* sp. Данных о морских продуцентах α -L-рамнозидаз на сегодня немного. Известны бактериальные продуценты *Novosphingobium* sp., *Pseudoalteromonas* и *Ralstonia pickettii*, синтезирующие внутриклеточный энзим [8, 9, 17], что несколько усложняет процедуру масштабного получения фермента в перспективе. Фермент (α -L-рамнозид-рамногидролаза – К.Ф. 3.2.1.40) обладает уникальной специфичностью к α -1,2, α -1,4 и α -1,6- связанным остаткам L-рамнозы, играет ключевую роль в метаболизме гликозидов и формировании биопленок микроорганизмов, участвует в деградации рамноолигосахаридов и липополисахаридов [15, 18]. Кроме того, в последние годы значительно возрос интерес к исследованиям данного фермента в связи с его биотехнологическим потенциалом в пищевой промышленности и медицине [8, 9, 19].

Было отмечено, что уровень α -L-рамнозидазной активности изученных штаммов находился в зависимости от состава среды, источника углерода и температуры выращивания, что характерно для вторичных метаболитов. Так, рамноза в качестве единственного источника углерода обеспечивала значительно более высокую ферментативную активность *Bacillus*, чем мальтоза. Было показано, что на синтетической среде №2 исследованные штаммы проявляли только следовые количества α -L-рамнозидазной активности. В то время как среда №3 в большей степени способствовала росту исследованных микроорганизмов и продукции α -L-рамнозидазы. Использование рамнозы в качестве источника углерода и, возможно, индуктора синтеза α -L-рамнозидаз было неоднократно показано для различных микроорганизмов [18]. Наряду с рамнозой, для индукции α -L-рамнозидазной активности нередко используют нарингин и другие, богатые флавоноидами и пектинами, субстраты [9, 18].

По уровню активности изученные бациллы уступают описанным бактериальным продуцентам α -L-рамнозидаз (*Pseudoalteromonas*, *Sphingomonas* sp., *Bacteroides* JY-6, *Pseudomonas paucimobilis*, *Clostridium stercorarium*, *Bacillus* sp. G1 1), а также микромицетам – представителям родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и *Fusarium* [18]. Однако они представляют несомненный интерес в плане сравнительного изучения структурно-функциональных особенностей гликозидаз различного происхождения. Исследованиями последних лет было показано, что бактериальные ферменты, деградирующие полисахариды водорослей, обладают уникальной структурой по сравнению с ферментами наземных микроорганизмов и принадлежат к новым семействам гликозилгидролаз [4, 5, 8]. Также было обнаружено, что подавляющее большинство бактерий доминантных родов *Zobellia* и *Maribacter* синтезируют широкий спектр гликозидаз, участвующих в деградации водорослевых полисахаридов, что, по-видимому, позволяет им занимать разнообразные экологические ниши в экстремальных условиях приливной зоны [2, 7]. Более того, способность продуцировать разнообразные гликозидазы при отсутствии антимикробной активности у представителей рода *Arenibacter* предположительно свидетельствует о ключевой роли этих ферментов в выживании и успешной конкуренции в морских микробных сообществах [1, 4, 8]. И, наконец, морские бактерии имеют особые характеристики, которые могут быть использованы в промышленных целях; например, два морских микроорганизма *Alreromonas* sp. 59 и *Vibrio* sp. S14 увеличивают синтез внеклеточных ферментов в условиях недостатка питательных веществ [7].

Изученные α -L-рамнозидазы продемонстрировали способность отщеплять концевую рамнозу как от синтетического субстрата, так и от природного флавоноида нарингина. Способность дерамнозировать нарингин свидетельствует о специфичности изученных α -L-рамнозидаз к отщеплению α -1,2-связанной рамнозы. Ферменты такой специфичности находят широкое применение в производстве глюкозидов флавоноидов, обладающих повышенной биодоступностью и активностью по сравнению с рамнозилированными полифенолами [18].

В некоторых случаях невысокую исходную активность микробных культур удастся индуцировать не только с помощью оптимизации углеродного и азотного питания, а также при использовании химических индукторов. В роли последних, в частности, могут выступать металлы и их координационные комплексы с биолигандами [10, 12]. Координационные соединения металлов уже показывали свою эффективность в качестве индукторов синтеза и активности некоторых ферментов [11, 20].

Изучение влияния ряда координационных соединений германия на биосинтез и активность α -L-рамнозидазы *Bacillus* sp. 19 показало, что эти вещества не являются перспективными в качестве индукторов биосинтеза ферментов. Наблюдаемое нами снижение ферментативной активности в процессе культивирования штамма *Bacillus* sp. 19 может быть следствием влияния комплексов германия на процесс синтеза протеинов посредством воздействия на системы клеточного деления либо нарушений транспорта белков из клетки в окружающую среду. Вместе с тем некоторые из этих соединений могут быть использованы для повышения активности α -L-рамнозидазы *Bacillus* sp. 19 путем формирования химических связей с протеиновой молекулой. Особого внимания заслуживают соединения 6 и 7, содержащие, кроме германия, медь(6) и никель(7), а также бипиридин и цитрат в качестве лигандов, которые повышали активность на 5–20%. Данный эффект может быть вызван образованием связей между карбоксильными и карбонильными остатками биолигандов комплексов с остатками аминокислот фермента либо образованием водородных связей между ними, приводящим к конформационным изменениям фермента. Различия в структуре комплексов объясняют и различия в указанных эффектах. Так, наряду с активацией, наблюдалось и ингибирование активности исследованной α -L-рамнозидазы веществами 1 и 8. Биолигандом в 1 соединении выступал фенантролиний бис(цитрат), а в 8, кроме германия, присутствовал атом железа. В дальнейших исследованиях эти ингибиторы могут быть использованы для выяснения субстратной специфичности фермента, природы функциональных групп, составляющих активный центр, механизма действия ферментов, участия определенных функциональных групп в поддержании специфической конформации молекулы фермента.

Таким образом, в результате исследования впервые была показана внеклеточная α -L-рамнозидазная активность у морских штаммов видов *Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaus* и *Bacillus licheniformis*. Наиболее активной была культура *Bacillus* sp. 19. Было отмечено снижение ферментативной активности культуры *Bacillus* sp. 19 в присутствии комплексов германия. Учитывая широкие возможности варьирования состава, строения, химической модификации координационных соединений германия, представляется перспективным продолжить исследования в данном направлении. Так, введением в молекулы комплексов новых биологически активных органических лигандов и металлов можно реализовать идею создания германийсодержащих супрамолекулярных соединений, способных не только увеличивать активность биотехнологически важных ферментов, но и индуцировать их биосинтез.

ГЛІКОЗИДАЗНА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS*, ВИДІЛЕНИХ З ЧОРНОГО МОРЯ

О.В. Гудзенко¹, Н. В. Борзова¹, Л.Д. Варбанець¹,
В. О. Іваниця², І.Й. Сейфулліна², О.Е. Марцинко²,
О.В. Пірожок², О.А. Чебаненко²

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

² Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65029, Україна

Резюме

Високий біотехнологічний потенціал морських мікроорганізмів як продуцентів ензимів стимулював в останні роки дослідження їх різноманіття та біологічних особливостей, в тому числі активний скринінг глікозидаз морських бактерій для комерційного використання. **Метою** даної роботи було вивчити здатність бактерій, виділених з донних осадових Чорного моря, продукувати глікозидази різної специфічності, а також дослідити можливість використання координаційних сполук германію для підвищення ферментативної активності бактерій роду *Bacillus*. **Методи.** Культивування бактерій здійснювали в глибинних умовах, як джерела вуглецю використовували мальтозу і рамнозу. Глікозидазні активності визначали методом Romero і Davis, білок — методом Lowry. Координаційні сполуки германію в концентрації 0,1 і 0,01% були використані як ефектори біосинтезу і активності α -L-рамнозидази. **Результати.** На підставі скринінгу 12 глікозидазних активностей (β -D-галактозидазної, β -D-глюкуронідазної, α -D-манозидазної, α -D-ксилозидазної, α -D-фукозидазної, β -D-ксилозидазної, β -D-глюкозидазної, N-ацетил- β -D-глюкозамінідазної, N-ацетил- α -D-глюкозамінідазної, N-ацетил- β -D-галактозамінідазної, α -D-глюкозидазної, α -L-рамнозидазної) у 8 з 10 досліджених культур *Bacillus* було виявлено тільки α -L-рамнозидазну (0,03–0,18 од/мг білка). Найбільш активною була культура *Bacillus* sp. 19. Відмічено зниження α -L-рамнозидазної активності культури *Bacillus* sp. 19 при внесенні комплексів германію (0,1 і 0,01%) в середовище росту. Показано, що біс(біпіридин)хлоромідь(II) біс(цитрат)германат(IV)октагідрат і тріс(біпіридин)нікель(II) біс(цитрат)германат(IV) моногідрат можуть бути використані для підвищення активності ензиму *Bacillus* sp. 19. **Висновки.** Вперше показана α -L-рамнозидазна активність морських штамів, представників видів *Bacillus licheniformis*, *Bacillus atrophaus*, *Bacillus subtilis*. Відмічено активацію α -L-рамнозидази *Bacillus* sp. 19 координаційними сполуками германію.

Ключові слова: глікозидази, α -L-рамнозидазна активність, бактерії Чорного моря, *Bacillus*, скринінг, координаційні сполуки германію.

GLYCOSIDASE ACTIVITY OF BACTERIA THE GENUS BACILLUS, ISOLATED FROM THE BLACK SEA

*E.V. Gudzenko¹, N.V. Borzova¹, L.D. Varbanets¹,
V.A. Ivanitsa², I.I. Seifullina², E.E. Martsinko²,
O.V. Pirozhok², E.A. Chebanenko²*

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

²Mechnikov Odessa National University,
2 Dvoryanskaya str., Odessa, 65082, Ukraine

Summary

High biotechnology potential of marine microorganisms as producers of enzymes has been driving extensive research of their diversity and biological features in recent years, including the active screening of glycosidases of marine bacteria for commercial applications. **The aim** of this paper was to study the ability of bacteria isolated from the bottom sediments of the Black Sea to produce glycosidases of various specificities, as well as to investigate the possibility of using coordination compounds of germanium to increase the enzymatic activity of bacteria of the genus *Bacillus*. **Methods.** The cultivation of bacteria was carried out in submerged conditions; maltose and rhamnose were used as carbon sources. Glycosidases activities were determined by the Romero and Davis method, protein - by the Lowry method. Coordination compounds of germanium were used as effectors of biosynthesis and activity of α -L-rhamnosidase in concentrations of 0.1 and 0.01%. **Results.** Based on the screening of 12 glycosidases activities (β -D-galactosidase, β -D-glucuronidase, α -D-mannosidase, α -D-xylosidase, α -D-fucosidase, β -D-xylosidase, β -D-glucosidase, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, N-acetyl- α -D-glucosaminidase, N-acetyl- β -D-galactosaminidase, α -D-glucosidase, α -L-rhamnosidase) among 10 cultures of *Bacillus*, α -L-rhamnosidase activity (0.03-0.18 U/mg protein) was detected in 8 strains. Culture of *Bacillus* sp. 19 was the most active. Decrease in α -L-rhamnosidase activity of a *Bacillus* sp. 19 was observed after introduction of germanium complexes (0.1 and 0.01%) into the growth medium. We showed that bis (bipyridine) chloromodynam (II) bis (citrate) germanate (IV) octahydrate and tris (bipyridine) nickel (II) bis (citrate) germanate(IV) monohydrate can be used to increase α -L-rhamnosidase activity of *Bacillus* sp. 19. **Conclusions.** α -L-Rhamnosidase activity of marine strains belonging to the species of *Bacillus licheniformis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis* was shown for the first time. Activation of α -L-rhamnosidase from *Bacillus* sp. 19 by coordination compounds of germanium was observed.

Key words: glycosidase, α -L-rhamnosidase activity, bacteria of the Black Sea, *Bacillus*, screening, coordination compounds of germanium.

1. Murphy BT, Jensen PR, Fenical W. The chemistry of marine bacteria. In: Fattorusso E., Gerwick W., Tagliatalata-Scafati O. (eds) Handbook of Marine Natural Products. Springer, Dordrecht. 2012; 153–190.
2. Joint I, Mühlhling M, Querellou J. Culturing marine bacteria – an essential prerequisite for biodiscovery. *Microb Biotechnol.* 2010; 3(5):564–575.
3. Schinke C, Martins T. Antibacterial compounds from marine bacteria, 2010–2015. *J Nat Prod.* 2017; 80(4):1215–1228.
4. Paulsen SS, Andersen B, Gram L, Machado H. Biological potential of chitinolytic marine bacteria. *Marine Drugs.* 2016; 14(12):230.
5. Kalitnik AA, Nedashkovskaya OI, Stenkova AM. Carrageenanolytic enzymes from marine bacteria associated with the red alga *Tichocarpus crinitus*. *J Appl Phycol.* 2017; 30(1):1–11.
6. El-Hassayeb AEH, Abdel-Aziz ZMS. Screening, production and industrial application of protease enzyme from marine bacteria. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2016; 5(7):863–874.
7. Bakunina IYu, Nedashkovskaya OI, Kim SB, Zvyagintseva TN, Mikhkhailov VV. Diversity of glycosidase activities in the bacteria of the phylum *Bacteroidetes* isolated from marine algae. *Microbiologia.* 2012; 81(6):155–160.
8. Michel G, Czjzek M. Polysaccharide-degrading enzymes from marine bacteria. In book: *Marine enzymes for biocatalysis: sources, biocatalytic characteristics and bioprocesses of marine enzymes.* Publisher: Wood head Publishing Limited Eds: Trincone A. 2013: 429–464.
9. Izzo V, Tedesco P, Notomista E, Pagnotta E, Di Donato A, Trincone A, Tramice A. α -Rhamnosidase activity in the marine isolate *Novosphingobium* sp. PP1Y and its use in the bioconversion of flavonoids. *J Mol Catal B Enzym.* 2014; 105: 95–103.
10. Nakamura T, Shimada Y, Takeda T, Sato K, Akiba M, Fukaya H. Organogermanium compound, Ge-132, forms complexes with adrenaline, ATP and other physiological cis-diol compounds. *Future Med Chem.* 2015;7(10):1233–1246.
11. Tezuka T, Higashino A, Akiba M, Nakamura T. Organogermanium (Ge-132) suppresses activities of stress enzymes responsible for active oxygen species in monkey liver preparation. *AER.* 2017; 5(2):13–23.
12. Ali MM, Noaman E, Kamal Sh, Soliman S, Ismail DA. Role of germanium L-cysteine α -tocopherol complex as stimulator of some antioxidant defense systems in gamma-irradiated rats. *Acta Pharm.* 2007; 57:1–12.
13. Lepikh YaI, Smyntyna VA, Snigur PO, Olikh YaM. Germanium coordination compounds – structure, properties, possible applications. *J Physics: Conference Series.* 2007; 76(1):012050.
14. Romero C, Manjon A, Bastida J. A method for assaying rhamnosidase activity of naringinase. *Anal Biochem.* 1985; 149(2):566–571.
15. Davis DW. Determination of flavonones in citrus juice. *Anal Biochem.* 1947; 19(1):46–48.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(2):265–275.

17. Orrillo AG, Ledesma P, Delgado OD, Spagna G, Breccia JD. Cold-active α -L-rhamnosidase from psychrotolerant bacteria isolated from a sub-Antarctic ecosystem. *Enzyme Microb Technol.* 2007; 40:236–241.
18. Yadav P, Chauhan AK, Singh PS. α -L-Rhamnosidase: sources, production, purification and characterization of the debittering enzyme. *IJBTR.* 2017; 7(1):1–10.
19. Alvarenga AE, Romero CM, Castro GR. A novel α -L-rhamnosidase with potential applications in citrus juice industry and in winemaking. *Eur Food Res Technol.* 2013; 237(6):977–985.
20. Shubchyns'ka AS, Varbanets LD., Seifullina II., Martsynko OE, Piesarohlo OH. [Effect of coordination germanium compounds on biosynthesis and activity of proteases in *Bacillus* sp. and *Yarrowia lipolytica*]. *Mikrobiol Z.* 2008; 70(4):3–9. Ukrainian.

Отримано 7.12.2018