

УДК 579.66

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ГАЛОАЛКАЛОТОЛЕРАНТНЫХ БАКТЕРИЙ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА

© 2023 г. Ю. Г. Максимова*, **, @, А. В. Шилова*, В. В. Егорова*,
В. А. Щетко***, А. Ю. Максимов*, **

*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –

филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, ул. Голева, 13, Пермь, 614081 Россия

**Пермский государственный национальный исследовательский университет, Букирева, 15, Пермь, 614990 Россия

***Государственное научное учреждение Институт микробиологии НАН, Купревича, 2, Минск, 220141 Беларусь

@E-mail: maks@iegm.ru

Поступила в редакцию 26.01.2022 г.

После доработки 31.08.2022 г.

Принята к публикации 01.09.2022 г.

Изучены особенности проявления гидролитической активности галоалкалотолерантных бактерий *Pseudomonas peli* 3-Т, *Microbacterium kitamiense* 16-ДБ и *Bacillus aequororis* 5-ДБ, выделенных из грунта территории содового шламохранилища и содового осадка действующего шламонакопителя АО “Березниковский содовый завод” (Пермский край, Россия). Показано, что максимальные активности внеклеточных липаз и амилаз трех исследованных бактерий проявлялись при pH 11 и высокой концентрации хлорида натрия (50–200 г/л). Культивирование *P. peli* 3-Т на минеральной среде с 0.5%-ным глицерином (источник углерода) и 0.03%-ной мочевины (источник азота) позволяет получить биомассу (6.9 г/л) и активность внеклеточной (1.26 Ед/л) и ассоциированной с клетками липазы (3.02 Ед/мг сухих клеток) с высоким экономическим коэффициентом потребления субстрата (138%). Показана эффективность иммобилизации клеток *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ для использования в биотрансформации липидов и крахмала. Клетки *P. peli* 3-Т, иммобилизованные адсорбцией на каолине и включением в структуру гелей альгината бария и агарозы, сохраняли от 40.4 до 63.8% от активности липазы клеток в суспензии. Иммобилизованные адсорбцией на каолине клетки *B. aequororis* 5-ДБ сохраняли 42.5% липазной и 90.7% амилазной активности по сравнению с исходными. При этом активности исследованных ферментов *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ сохранялись в течение 6-ти последовательных реакций. Амилазная активность иммобилизованных клеток *M. kitamiense* 16-ДБ при адсорбции на каолине и хитозане снижалась до 2.7–3.5% от исходной и полностью ингибировалась при иммобилизации включением в гели альгината бария или агарозы.

Ключевые слова: амилаза, липаза, культивирование, иммобилизация бактериальных клеток, галотолерантные бактерии, алкалотолерантные бактерии

DOI: 10.31857/S1026347022700068, **EDN:** HANYNK

Одними из востребованных ферментов для пищевой, химической, фармацевтической, целлюлозно-бумажной промышленности и кормопроизводства являются липазы (триацил-глицеролацилгидролазы, Е.С.3.1.1.3), катализирующие расщепление сложноэфирной связи в триглицеридах, а также способные осуществлять реакцию переэтерификации – обмена структурных элементов в молекулах сложных эфиров (Безбородов, Загустина, 2014). Липазы разных организмов (животные, растения, микроорганизмы: микромицеты, бактерии) активны при разном диапазоне pH, температуры и минерализации среды. Липазы микро-

организмов, устойчивые в щелочной среде, могут быть перспективны для производства моющих средств, органического синтеза, пищевой и фармацевтической промышленности (Fujinami, Fujisawa, 2010; Sarethy *et al.*, 2011). Ферменты, стабильные в среде с высоким содержанием соли, обычно активны также в органических и водно-органических смесях (Kumar *et al.*, 2012; DasSarma, DasSarma, 2015), поэтому устойчивые к высокой минерализации среды липазы могут применяться для переэтерификации жирных кислот в биотехнологическом производстве биодизельного топлива, протекающем в присутствии органических растворителей.

Высокая специфичность липаз позволяет свести к минимуму негативные побочные реакции, связанные с образованием солей жирных кислот, по сравнению с аналогичным процессом промышленного органического синтеза (Vajaj *et al.*, 2010).

Использование липаз в качестве биокатализаторов в промышленных масштабах имеет свои недостатки: их выделение и очистка экономически затратны, а фермент в растворе не может быть использован многократно (López-Fernández *et al.*, 2021). Липазы, ассоциированные с клетками, более стабильны. Увеличить стабильность такого фермента, а также обеспечить его многократное применение можно иммобилизацией (ограничением подвижности) целых клеток продуцирующих его микроорганизмов (Zaitsev *et al.*, 2019). Микробные клетки в иммобилизованном состоянии защищены от неблагоприятных воздействий внешней среды, в результате чего они могут эффективно трансформировать субстрат в течение более длительного времени и при более высокой концентрации, а также в более широком диапазоне pH, относительно свободных клеток (Eş *et al.*, 2015), поэтому использование иммобилизованных микробных клеток в биотехнологических процессах повышает их эффективность (Максимов и др., 2007).

Амилазы (КФ 3.2.1.1) – ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз крахмала с образованием декстринов или глюкоолигосахаридов. Они составляют около 25% ферментов, получаемых в производственных масштабах, используются преимущественно в пищевой промышленности (в хлебопечении, для осветления фруктовых соков), обработке бумаги и текстиля. Амилазы галоалкалофильных микроорганизмов сохраняют активность в диапазоне pH 8–11, перспективны для применения в производстве моющих средств, способны повысить эффективность процессов разжижения крахмала при промышленном использовании (Sarethy *et al.*, 2011).

В экстремальных условиях среды природного или антропогенного происхождения могут развиваться микроорганизмы с уникальными свойствами (Gupta *et al.*, 2014). В щелочной и высокоминерализованной среде микроорганизмы продуцируют внеклеточные ферменты (Fujinami, Fujisawa, 2010; Sarethy *et al.*, 2011), которые представляют интерес для биотехнологического применения в условиях высокого pH и низкой активности воды.

В связи с вышеизложенным, поиск новых продуцентов амилаз и липаз среди микроорганизмов, обитающих в щелочных высокоминерализованных биотопах, представляется перспективным для производства моющих средств, кормов для сельскохозяйственных животных, в переработке отходов.

Цель работы сфокусирована на изучении условий культивирования и иммобилизации клеток

галоалкалотолерантных штаммов *Pseudomonas peli* 3-Т – продуцента липазы, *Microbacterium kitamiense* 16-ДБ – продуцента амилазы и *Bacillus aequororis* 5-ДБ – продуцента липазы и амилазы, выделенных из грунта содового производства и содового осадка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы, условия культивирования и ростовые характеристики. Из грунта восстанавливаемых после эксплуатации территорий содового шламохранилища АО “Березниковский содовый завод” (г. Березники, Пермский край, Россия) были ранее выделены микроорганизмы *P. peli* 3-Т (GenBank MT860703) – продуцент липазы, *B. aequororis* 5-ДБ (GenBank MT875306) – продуцент липазы и амилазы. Из содового осадка был выделен *M. kitamiense* 16-ДБ (GenBank MT872083) – продуцент амилазы (Шилова и др., 2021).

Культуры исследуемых микроорганизмов выращивали на минеральной среде Пфеннига (г/л): KH_2PO_4 , 0.3; MgCl_2 , 0.3, CaCl_2 , 0.03; дрожжевой экстракт, 0.5; раствор микроэлементов по Липперту–Витману (1 мл). Источники азота (N): мочевины, хлорид аммония или нитрат аммония, 0.03%. Для проявления липазной активности этих бактерий использовали источники углерода (C): глицерин (чда, Россия), твин-20 (“Ferak”, Германия), твин-80 (“Ferak”, Германия), оливковое масло (“Global Village”, Испания) или подсолнечное масло (“Altero”, Россия), 1%. Для проявления амилазной активности использовали источник C: крахмал растворимый (ЗАО “ННПЦ ГИП”, Россия), 1%.

Все культуры выращивали в конических колбах (250 мл), в которые вносили 100 мл среды, инокулировали суспензией микроорганизмов (0.5 мл, $\text{ОП}_{540} = 1.0$) и инкубировали на роторной качалке (115 об./мин, 25°C, 8 сут.) Бактериальный рост оценивали по изменению ОП_{540} среды на фотоэлектрориметре КФК-3, ширина кюветы 1 см (Россия). Полученную суспензию клеток центрифугировали (14 000 g, 10 мин), осадок высушивали (50°C, 48 ч) и взвешивали. Затем строили калибровочную кривую зависимости ОП_{540} суспензии от веса клеток (г/л).

Удельную скорость роста (μ , ч⁻¹) рассчитывали по формуле:

$$\mu = 1/\text{ОП}_0 (\Delta\text{ОП}/\Delta t), \quad (1)$$

где ОП_0 – оптическая плотность при λ 540 нм в момент времени t_0 ; $\Delta\text{ОП}$ – изменение оптической плотности культуральной среды при λ 540 нм за время Δt , ч.

Сухую биомассу клеток (X) определяли по разности ее максимальной и начальной величин

$$X = X_{\max} - X_0, \text{ г/л}, \quad (2)$$

где X_0 – биомасса в начальное время, X_{\max} – максимальная биомасса по окончании культивирования.

Экономический коэффициент потребления субстрата (Y , %) определяли по формуле:

$$Y = X/C \times 100, \quad (3)$$

где X – биомасса после инкубирования, г/л; C – масса потребленного субстрата, г/л.

Определение активности липазы бактериальных штаммов. Липазную активность бактерий определяли биохимической реакцией с *p*-нитрофениллауратом, который под действием липазы рас-

щеплялся с образованием окрашенного продукта *p*-нитрофенола (Bulow, Mosbach, 1987).

Суспензию клеток (4 мл) центрифугировали (4500 g, 20 мин), отделяли супернатант, осадок 2–3 раза промывали фосфатным буфером (4 мл, pH 8) и ресуспендировали в 4 мл этого же буфера. Затем вносили 50 мкл *p*-нитрофениллаурата (10 мМ) и инкубировали 1 ч при 25°C. Активность липазы определяли по приросту оптической плотности при λ 405 нм (спектрофотометр Ultraspec 3000 “GE Healthcare”, США).

Удельную активность липазы (E) рассчитывали по формуле:

$$E = \text{ОП}_{405} \times 10^6 / (18.3 \times 10^3 lt), \text{ (мкмоль мин}^{-1} \text{ л}^{-1}\text{)}, \quad (4)$$

где ОП_{405} – оптическая плотность при λ 405; 10^6 – коэффициент пересчета моль в мкмоль; 18.3×10^3 – коэффициент молярной экстинкции *p*-нитрофенола, $\text{л} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$; l – толщина кюветы, см; t – время инкубации пробы, мин.

Удельную липазную активность выражали в мкмоль продукта реакции, образующегося в минуту (E_d) на литр среды культивирования ($E_d/\text{л}$) или на мг сухих клеток ($E_d/\text{мг}$).

Определение активности амилазы бактериальных штаммов. Активность амилазы оценивали с помощью коммерческого набора реактивов Альфа-Амилаза-Ольвекс ООО “Ольвекс Диагностикум” (Россия). Реакция основана на гидролизе синтетического субстрата этилиден-*p*-нитрофенилмальтогептазиды с образованием нитрофенилмальтозидов, которые подвергаются дальнейшему расщеплению альфа-глюкозидазой до глюкозы и окрашенного продукта *p*-нитрофенола. Суспензию клеток бактерий разделяли на осадок и супернатант. Осадок промывали фосфатным буфером (4 мл, pH 8) 2–3 раза и ресуспендировали в 4 мл того же буфера. Реакцию проводили в плоскодонном 96-луночном полистироловом планшете. К 100 мкл образца добавляли 100 мкл реагента коммерческого набора, содержащего NEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) – буферную основу, pH 8, раствор хлористого магния и натрия, α -глюкозидазу, холат натрия, азид натрия и субстрат 4,6-этилиден(G7)-*p*-нитрофенил-(G1)- α , D-мальтогептозид. Активность фермента определяли по изменению оптической плотности среды при λ 405 нм, измеряемой на планшетном ридере Infinite M1000 “Tecan” (Швейцария) пятикратно с интервалом в 1 мин. Активность амилазы рассчитывали по формуле (4).

Влияние pH и концентрации хлорида натрия на липазную и амилазную активность бактерий. Культуру *P. peli* 3-Т выращивали на среде с 1%-ным твином-80, *M. kitamiense* 16-ДБ – с 1%-ным крахмалом растворимым, *Bacillus aequororis* 5-ДБ – с 1%-ным крахмалом растворимым для индукции амилазной активности или 1%-ным твином-80 – липазной активности. Исследовали влияние разных концентраций NaCl (0.5, 5, 50, 100, 200 г/л) и pH (6, 8, 9, 11) на рост *P. peli* 3-Т, *M. kitamiense* 16-ДБ и *B. aequororis* 5-ДБ. После культивирования биомассу бактерий отделяли от культуральной среды центрифугированием (20 мин, 4500 g) и определяли внеклеточную и ассоциированную с клетками липазную и амилазную активность.

Иммобилизация бактериальных клеток методом адсорбции на неорганическом (каолин) и органическом (хитозан) носителях. Суспензию клеток *P. peli* 3-Т, *M. kitamiense* 16-ДБ и *B. aequororis* 5-ДБ центрифугировали (4500 g, 20 мин), надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в фосфатном буфере (pH 8), центрифугировали повторно при указанном режиме и осадок промывали. Затем определяли ОП_{540} суспензии клеток на фотоэлектроколориметре КФК-3 (Россия).

Суспензию клеток в фосфатном буфере смешивали с каолином (“Merck”, Германия) в соотношении 10 мл суспензии/0.5 г каолина и инкубировали 60 мин на шейкере (115 об./мин, 25°C). Затем эту суспензию фильтровали через бумажный фильтр “красная лента” (ООО “Мелиор XXI”, Россия) и определили ОП_{540} фильтрата. Осадок на фильтре промывали буферным раствором и определяли ОП_{540} промывного раствора.

Массу адгезированных (иммобилизованных) на каолине клеток ($M_{\text{кл}}$, мг) определяли по формуле:

$$M_{\text{кл}} = CV (\text{ОП}_{\text{исх}} - \text{ОП}_{\text{фильтр}} - \text{ОП}_{\text{смыв}}) / \text{ОП}_{\text{исх}}, \quad (5)$$

Таблица 1. Рост (+) бактериальных штаммов на среде Пфеннига с разными источниками углерода

Углерод, 0.1%	<i>P. peli</i> 3-Т	<i>M. kitamiense</i> 16-ДБ	<i>B. aequororis</i> 5-ДБ
Глюкоза	+	+	–
Дульцит	–	+	–
Инозит	+	+	+
Ксилоза	–	+	–
Лактоза	–	+	–
Мальтоза	–	+	+
Маннит	+	+	–
Сахароза	+	+	–
Сорбит	+	+	–
Сукцинат	+	+	+
Цитрат	+	+	–

где C – концентрация клеток в суспензии до адгезии, мг/мл, V – объем суспензии, из которой адгезировали клетки, мл; $ОП_{исх}$ – оптическая плотность суспензии клеток до адгезии; $ОП_{фильтр}$ – оптическая плотность фильтрата; $ОП_{смыв}$ – оптическая плотность промывного раствора.

Величину адсорбции A (мг сухих кл./г носителя) определили по формуле:

$$A = M_{кл} \times 1000/m, \quad (6)$$

где m – масса носителя, мг.

Для иммобилизации клеток на хитозане (“Sigma”, Япония) получали гранулы: готовили 2%-ный раствор хитозана в 2%-ной уксусной кислоте и накапывали с помощью шприца объемом 5 мл в 1 М раствор КОН, инкубировали при комнатной температуре в течение 4 ч, в результате получали отвердевшие гранулы геля хитозана. Полученные гранулы промывали 0.01 М калий-фосфатным буфером, рН 7.2 ± 0.2 до нейтральной реакции промывного раствора и затем активировали инкубацией с равным объемом 2.5%-ного глутарового альдегида 12 ч. Трижды промывали гранулы фосфатным буфером, объем которого в 2 раза превышал таковой альдегида. Затем к гранулам неактивированного и активированного глутаровым альдегидом хитозана добавляли суспензию клеток, и помещали на 4 ч в холодильник. Массу адгезированных клеток на хитозане определяли, как описано выше.

Иммобилизация бактериальных клеток *P. peli* 3-Т и *M. kitamiense* 16-ДБ методом включения в структуру геля альгината и агарозы. Суспензию бактерии смешивали со стерильным раствором 2%-ного альгината натрия (“Fluka”, Швейцария), отношение 1 : 2), а затем полученную смесь набирали в шприц и выдавливали в охлажденный 0.1 М раствор хлорида бария. Полученные таким способом

гранулы альгината бария диаметром 2 мм, содержащие клетки бактерий, ресуспендировали в свежем растворе $BaCl_2$, выдерживали 24 ч при $4-6^\circ C$ и отмывали дистиллированной водой.

Суспензию бактериальных клеток в 0.01 М калий-фосфатным буфере (рН 7.2 ± 0.2) смешивали с 4%-ным раствором агарозы (“Хеликон”, Россия) в соотношении 1 : 3 (при $40-45^\circ C$). Полученную смесь разливали в чашки Петри (слой 2 мм) и после ее застывания нарезали скальпелем на квадраты (2×2 мм).

У полученных таким образом иммобилизованных в альгинате и агарозе клеток определяли ферментативную активность.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение характеристики роста галоалкало-толерантных штаммов. Рост *P. peli* 3-Т, *M. kitamiense* 16-ДБ и *B. aequororis* 5-ДБ оценивали на среде с различными источниками С (табл. 1). Показано, что *M. kitamiense* 16-ДБ способен расти на всех 11-ти источниках С, *P. peli* 3-Т – на глюкозе, инозите, манните, сахарозе, сорбите, сукцинате, цитрате, а *B. aequororis* 5-ДБ – только на инозите, мальтозе и сукцинате.

Динамика роста *P. peli* 3-Т на среде с различными источниками С (глицерин, твин-20, подсолнечное и оливковое масло) и N (мочевина, хлорид и нитрат аммония) показана на рис. 1. Эти соединения С способны индуцировать липазную активность.

Установлено, что глицерин является лучшим источником С для накопления биомассы *P. peli* 3-Т ($ОП_{540} = 1.6 \pm 0.4$). Эти псевдомонады утилизировали также твин-20, подсолнечное и оливковое масло (в сочетании с источниками N), однако с внесением мочевины рост был наибольшим, а время адаптации к этим источникам С практически не выявлено. Следует отметить, что рост этой культуры на растительных маслах характеризовался агрегацией ее клеток, что приводило, в свою очередь, к снижению оптической плотности жидкой среды. Кроме того, на среде с растительными маслами отмечен меньший выход ее биомассы, что связано, очевидно, с их гидрофобностью и меньшей доступностью растительных масел для клеток.

Определено накопление биомассы *P. peli* 3-Т, активность внеклеточной и ассоциированной с клетками липазы, эффективность использования субстрата и удельная скорость роста в логарифмической фазе (табл. 2). Удельная скорость роста *P. peli* 3-Т была наибольшей в среде с глицерином (1%) и нитратом аммония (0.03%), однако этот источник N ингибировал активность внеклеточной липазы и в дальнейших экспериментах не использовался.

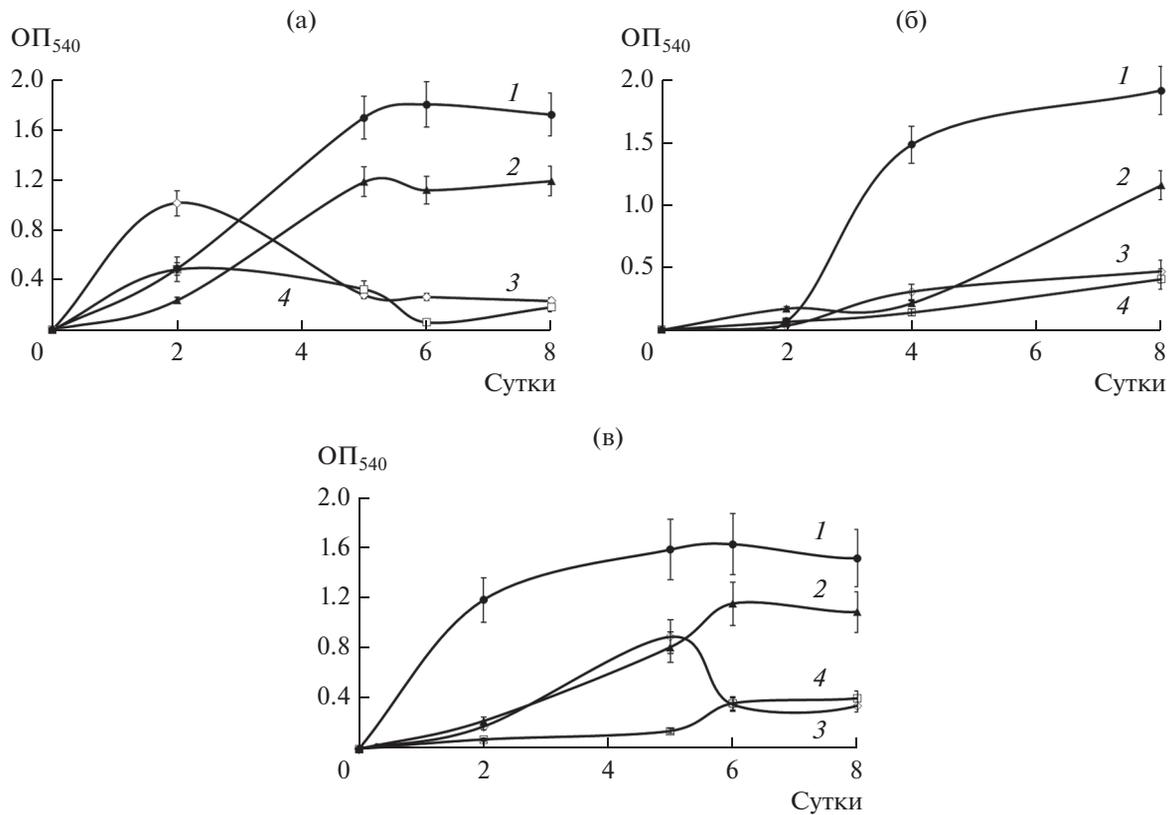


Рис. 1. Рост *P. peli* 3-Т на среде с разными источниками углерода: 1 – глицерином, 2 – твин-20, 3 – подсолнечным маслом, 4 – оливковым маслом и азота: а – мочевиной, б – нитратом аммония, в – хлоридом аммония. ОП₅₄₀ – оптическая плотность при λ 540 нм.

Наибольший выход биомассы *P. peli* 3-Т (9.1–10.5 г/л) был получен на среде с глицерином (1%), большой – с глицерином (0.5%). Также высокие значения этого показателя наблюдались при росте на твине-20 и подсолнечном масле (с мочевиной). Следовательно, наиболее эффективно используемым углеродным субстратом для *P. peli* 3-Т оказался глицерин (0.5–1%), кроме того, этот вариант эксперимента характеризовался и высоким экономическим коэффициентом потребления.

Установлено, что внесение мочевины (источник N) и глицерина (источник C) в питательную среду способствует увеличению липазной активности *P. peli* 3-Т. Активность липазы в надосадочной жидкости среды с глицерином (0.5%) и мочевиной достигала 1.26 Ед/л, а с другими источниками C и N – не превышала 0.6 Ед/л. Внесение твин-20 в среду не вызывало увеличения внеклеточной липазной активности *P. peli* 3-Т.

Ассоциированная с клетками липазная активность *P. peli* 3-Т при росте с мочевиной и глицерином (0.5 и 1%) достигала 3.02 и 1.81 Ед/мг соответственно, с другими источниками C и N не превышала 1.26 Ед/мг. Растительные масла не способствовали увеличению активности ассоциированной с клетками липазы для этого штамма.

Таким образом установлено, что мочевина и глицерин как источники N и C способствуют увеличению как внеклеточной, так и ассоциированной с клетками липазной активности *P. peli* 3-Т. Активность липазы, ассоциированной с его клетками, с твин-20 достигает 0.5–0.8 Ед/мг. В то же время растительные масла в присутствии мочевины индуцировали только внеклеточную липазу, а твин-20 – преимущественно ассоциированную с клетками. Такой факт можно объяснить гидрофобностью растительных масел: их липиды не способны проникать через клеточные мембраны (они являются субстратом только для внеклеточных липаз). Однако твин-20, как амфифильный субстрат, способен проникать в периплазматическое пространство клеток и, тем самым, становится доступным для ассоциированных с клетками липаз.

Полученные результаты свидетельствуют об индуцибельном характере экспрессии липазы у *P. peli* 3-Т, что соотносится с данными литературы для других микроорганизмов (Zhang *et al.*, 2003; Grbavčić *et al.*, 2007; Шеламова, Тырсин, 2012).

В итоге, для получения наибольшей биомассы культуры *P. peli* 3-Т, обладающей липазной активностью, предложена среда Пфеннига с добавле-

Таблица 2. Биомасса *P. peli* 3-Т в среде Пфеннига с разными источниками С и N, липазная активность (ЛА), удельная скорость роста в логарифмической фазе (μ) и экономический коэффициент потребления субстрата (Y)

С, %	N, 0.03%	Биомасса сухая, г/л	ЛА, *Ед/л (**Ед/мг)	μ , ч ⁻¹	Y, %
Глицерин, 1	(NH ₂) ₂ CO	9.3	0.6 (1.81)	0.03	93
	NH ₄ Cl	9.1	0 (1.26)	0.04	91
	NH ₄ NO ₃	10.5	0.001 (1.13)	0.41	105
Глицерин, 0.5	(NH ₂) ₂ CO	6.9	1.26 (3.02)	0.08	138
Твин-20, 1	(NH ₂) ₂ CO	6.4	0.06 (0.5)	0.04	64
	NH ₄ Cl	6.1	0.1 (0.6)	0.04	61
	NH ₄ NO ₃	6.3	0.0009 (0.8)	0.04	63
Подсолнечное масло, 1	(NH ₂) ₂ CO	8.9	0.6 (0.003)	0.1	89
	NH ₄ Cl	4.1	0 (0.007)	0.04	41
	NH ₄ NO ₃	2.5	0.13 (0.09)	0.005	25
Оливковое масло, 1	(NH ₂) ₂ CO	1.1	0.23 (0.2)	0.0003	10
	NH ₄ Cl	2.8	0.14 (0.004)	0.06	28
	NH ₄ NO ₃	2.2	0.01 (0.004)	0.02	22

Примечание. * Активность внеклеточной липазы, ** Активность липазы, ассоциированной с клеточной поверхностью.

нием глицерина (источник С, 0.5%) и мочевины (источник N, 0.3 г/л).

Влияние pH и концентрации хлорида натрия в среде культивирования на липазную и амилазную активность *P. peli* 3-Т, *M. kitamiense* 16-ДБ и *B. aquororis* 5-ДБ. Поскольку изучаемые штаммы бактерий были изолированы из щелочной среды с высокой концентрацией хлорида натрия, то мы изучили их гидролитическую активность в зависимости от этих факторов. Наибольшая активность внеклеточной липазы *P. peli* 3-Т оказалась при pH 11 и 100 г/л NaCl, а наименьшая – при pH 6. Наибольшая активность ассоциированной с клетками липазы выявлена при pH 8 и 0.5–100 г/л

NaCl (рис. 2). Высокий уровень внеклеточной липазной активности *P. peli* 3-Т проявлялся в исследованном диапазоне pH (8–11). Изменение концентрации NaCl (от 0.5 до 200 г/л) влияло незначительно на активность внеклеточной липазы при изученном диапазоне pH.

Следует отметить, что активность ассоциированной с клетками липазы, была высокой и при pH 6.0, что свидетельствует о сохранности этого фермента в периплазматическом пространстве. При pH 11 и высокой концентрации NaCl (50–200 г/л) активность ассоциированной с клетками липазы достигала 1.0–1.4 Ед/мг сух. веса клеток, а с 0.5 и 5 г/л NaCl – не превышала 0.3 Ед/мг.

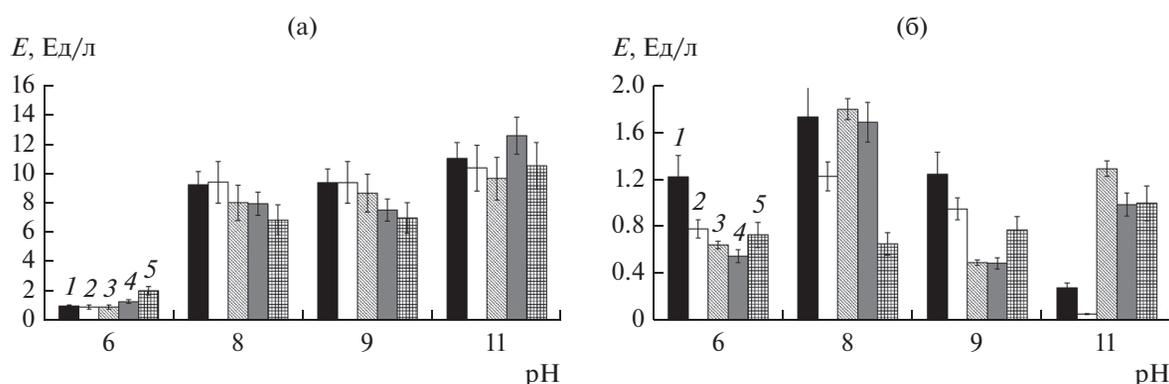


Рис. 2. Влияние pH и концентрации NaCl (1 – 0,5, 2 – 5, 3 – 50, 4 – 100, 5 – 200 г/л) на липазную активность *P. peli* 3-Т: (а) – внеклеточная, (б) – ассоциированная с клеточной поверхностью.

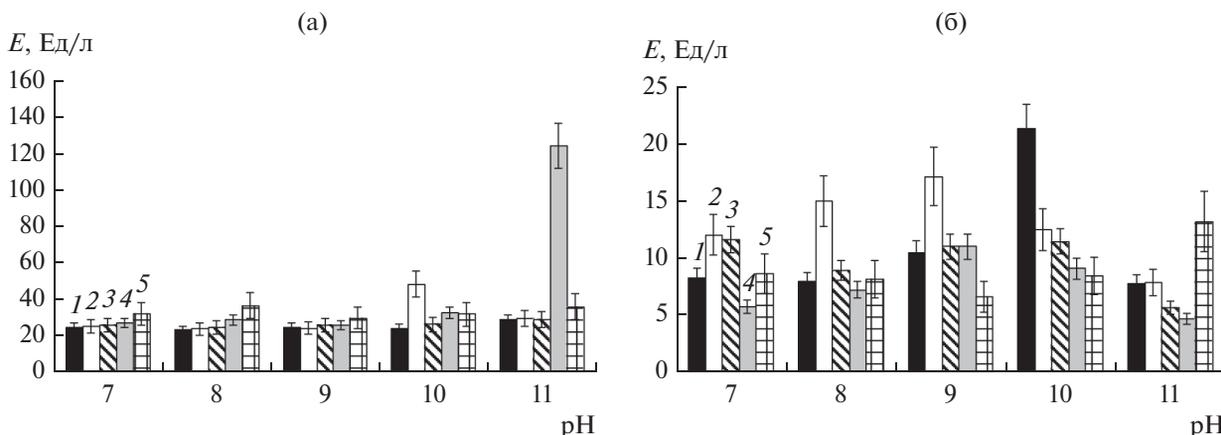


Рис. 3. Влияние pH и концентрации NaCl (1 – 0,5, 2 – 5, 3 – 50, 4 – 100, 5 – 200 г/л) на амилазную активность *M. kitamiense* 16-ДБ (а) – внеклеточная, (б) – ассоциированная с клеточной поверхностью.

Установлено, что у *M. kitamiense* 16-ДБ активность внеклеточной амилазы практически не изменялась при варьировании концентрации хлорида натрия от 0,5 до 200 г/л и pH от 7 до 11, а максимум ее активности наблюдался при pH 11 и 100 г/л соли. При этом ассоциированная с клетками амилазная активность этого штамма была максимальной при pH 10 и 0,5 г/л NaCl (рис. 3).

Штамм *B. aequororis* 5-ДБ, как упомянуто выше, обладает амилазной и липазной активностью. Показано, что *B. aequororis* 5-ДБ характеризуется высокой активностью этих внеклеточных ферментов в щелочном диапазоне pH (максимум при pH 11). В среде с pH 11 активность ферментов была выше с большим содержанием соли (50 г/л), (рис. 4). При этом ассоциированная с клетками липазная активность этого штамма была наибольшей при pH 10 и 0,5 г/л NaCl, а ассоциированная с клетками амилазная активность – при pH 9 и 0,5 г/л соли.

Показано, что наибольшая активность внеклеточных липаз и амилаз трех исследованных бактерий, выявлена при pH 11 и высокой концентрации NaCl (50–200 г/л). Очевидно, что высокое значение pH и содержание NaCl в среде для роста алкалофильных и алкалотолерантных прокариотов является благоприятным. Известно, что высокая концентрация катионов Na обеспечивает поддержание электрохимического градиента протонов в сильнощелочной среде за счет работы антипортера Na⁺/H⁺ (Kgulwich *et al.*, 2011). Это энергетически выгодное состояние клетки может обеспечить усиление метаболических процессов, в том числе и экспрессии генов гидролитических ферментов.

Иммобилизация клеток *P. peli* 3-Т, *M. kitamiense* 16-ДБ и *B. aequororis* 5-ДБ методом адсорбции. В биотехнологии часто возникает необходимость в иммобилизации клеток микроорганизмов. Известно, что иммобилизация клеток дает возмож-

ность многократного использования такого биокатализатора и осуществления непрерывных процессов. Адсорбция и адгезия микробных клеток на разных носителях обычно предпочтительны, поскольку не вызывают ингибирования их ферментативной активности или массообмена. Так, если липаза или амилаза ассоциированы с клеточной поверхностью или находятся в периплазматическом пространстве клетки, целесообразно иммобилизовать микробные клетки. Большинство проведенных ранее исследований по данному направлению посвящено иммобилизации клеток грибов с липазной активностью на гранулах полиуретана, полистирола, губчатых материалах естественного и искусственного происхождения (Oda *et al.*, 2005; Hama *et al.*, 2007; Tamalampudi *et al.*, 2008; Koda *et al.*, 2010; Arumugam, Ponnusami, 2014; Ferrarezi *et al.*, 2014; Surendhiran *et al.*, 2014; Amoah *et al.*, 2016; Guldhe *et al.*, 2016; Rakchai *et al.*,

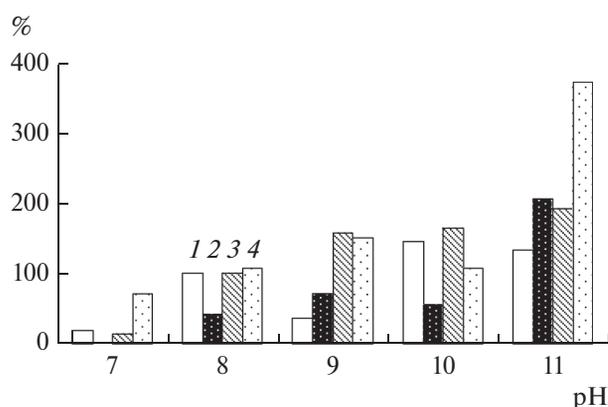


Рис. 4. Липазная (1, 2) и амилазная (3, 4) активность (% от таковой при pH 7 и 0,5 г/л NaCl) в супернатанте культуры *Bacillus aequororis* 5-ДБ при различных pH и концентрациях NaCl: 0,5 (1, 3) и 50 г/л (2, 4).

Таблица 3. Характеристика иммобилизованных клеток *P. peli* 3-Т, *M. kitamiense* 16-ДБ и *B. aequororis* 5-ДБ на разных носителях

Носитель/способ иммобилизации	Масса адсорбированных клеток, мг/г	Активность, Ед/мг	Активность после иммобилизации, %
<i>P. peli</i> 3-Т (исходная суспензия 2.17 г/л)			
Липазная активность (0.930 ± 0.251 Ед/мг)			
Каолин/адсорбция	42.6 ± 5.2	0.376 ± 0.058	40.4
Альгинат бария/включение в гель	—	0.446 ± 0.072	47.9
Агароза / включение в гель	—	0.590 ± 0.300	63.8
<i>M. kitamiense</i> 16-ДБ (исходная суспензия 3.23 г/л)			
Амилазная активность (3.445 ± 0.713 Ед/мг)			
Каолин/адсорбция	57.84 ± 2.98	0.096 ± 0.023	2.8
Неактивированный хитозан/адсорбция	7.97 ± 1.97	0.098 ± 0.015	2.8
Активированный хитозан/ковалентная сшивка	6.23 ± 1.11	0.122 ± 0.072	3.5
<i>B. aequororis</i> 5-ДБ (исходная суспензия 1.95 г/л)			
Липазная активность (20.765 ± 1.232 Ед/мг)			
Каолин/адсорбция	46.71 ± 3.45	8.819 ± 0.189	42.5
Амилазная активность (12.386 ± 0.272 Ед/мг)			
Каолин/адсорбция	46.71 ± 3.45	11.233 ± 0.19	90.7

2016). Культуру продуцента, как правило, выращивают вместе с материалом носителя, в результате чего происходит самоиммобилизация – прораствание гиф гриба в пористом материале. Такие биокатализаторы использовали в основном в процессах получения биодизельного топлива. В ряде работ показано, что иммобилизованные клетки продуцировали липазу во внешнюю среду (Taskin *et al.*, 2016). Есть и примеры иммобилизации клеток бактерий *Bacillus subtilis* (Oliveira *et al.*, 2019) и *Ralstonia pickettii* в геле агары, альгината и полиакриламида (Nemachander *et al.*, 2001).

В настоящем исследовании проводили иммобилизацию *P. peli* 3-Т и *M. kitamiense* 16-ДБ методами адсорбции на каолине и определяли ассоциированную с клетками ферментативную активность. Установлено, что при адсорбции *P. peli* 3-Т на каолине сохранялось 40.4% исходной липазной активности (табл. 3). Адсорбированные на каолине клетки *B. aequororis* 5-ДБ сохраняли 42.5% липазной и 90.7% амилазной активности. При этом наблюдалась значительная стабилизация активности этих ферментов. Кроме того, активность сохранялась для 6-ти повторных реакций трансформации субстрата (не менее 74% от исходной).

При адсорбции *M. kitamiense* 16-ДБ на каолине амилазная активность значительно снижалась и составляла лишь 2.8%. Такое снижение наблюда-

ли при адсорбции клеток этой бактерии на активированном и неактивированном хитозане (2.8 и 3.5% соответственно). Амилаза актинобактерии *M. kitamiense* 16-ДБ локализована не внутри клеток и не в периплазматическом пространстве, как у грамотрицательных бактерий, а ассоциирована с поверхностью, а также не защищена полисахаридной капсулой, как у бацилл, поэтому наблюдаемое снижение активности иммобилизованных клеток может быть обусловлено контактом с мелкодисперсным носителем (табл. 3).

Иммобилизация клеток *P. peli* 3-Т и *M. kitamiense* 16-ДБ методом включения в структуру гелей альгината бария и агарозы. При включении клеток *P. peli* 3-Т в структуру геля альгината бария и агарозы наблюдался высокий уровень сохранения активности липазы: 47.9 и 63.8% соответственно (табл. 3). Клетки в структуре альгината бария сохраняли ферментативную активность на протяжении ряда циклов использования, так за 6 циклов сохранялось 65.2% активности от таковой первого цикла. Стабильность полученного нами биокатализатора при повторных циклах трансформации субстрата была выше таковой, известной в литературе: клетки *Ralstonia pickettii* с липазной активностью использовали только 3 раза с потерей 10% активности в каждом цикле (Nemachander *et al.*, 2001).

Крахмал является высокомолекулярным полимерным субстратом, который не проникает в клетки, поэтому амилазы гидролизуют его во внеклеточной среде. Много исследований посвящено иммобилизации выделенных амилаз (Аккава *et al.*, 2012; Mageswari *et al.*, 2012; Verma, Raghav, 2021). В научной литературе есть также сведения об иммобилизации клеток дрожжей для получения амилазы в процессе их культивирования. Так, клетки *Saccharomycopsis fibuligera* A11-с были включены в структуру геля поливинилового спирта (Gen *et al.*, 2014), а клетки *Saccharomyces cerevisiae* иммобилизованы на бактериальной целлюлозе (Khanpanuek *et al.*, 2022). У культуры *M. kitamiense* 16-ДБ большая часть амилазной активности ассоциирована с клетками, поэтому в нашей работе были иммобилизованы бактериальные клетки с активностью амилазы.

Показано, что иммобилизация *M. kitamiense* 16-ДБ в структуре гелей агарозы и альгината бария приводит к полному ингибированию амилазной активности. Ингибирование ферментативной активности амилазы может быть связано с диффузионными затруднениями при конверсии сложного полимерного субстрата иммобилизованными клетками.

Из полученных данных можно заключить, что иммобилизованные клетки *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ сохраняют значительную часть липазной и/или амилазной активности и могут эффективно использоваться для гидролиза соответствующих субстратов.

* * *

Таким образом, была изучена активность внеклеточных гидролаз (липаза, амилаза) трех алкалолентных штаммов (*P. peli* 3-Т, *B. aequororis* 5-ДБ, *M. kitamiense* 16-ДБ) в условиях повышенного значения pH и содержания хлорида натрия. Наибольшая активность липазы (*P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ) и амилазы (*M. kitamiense* 16-ДБ и *B. aequororis* 5-ДБ) выявлена при сочетании высокого значения pH (11) и содержания NaCl (50–200 г/л) в среде. Показано, что клетки *P. peli* 3-Т, иммобилизованные на каолине, в геле альгината бария и агарозы, сохраняли 40–64% исходной активности липазы; *B. aequororis* 5-ДБ (каолин) – 42% липазы и 91% амилазы; *M. kitamiense* 16-ДБ (каолин, хитозан) – 3–4% амилазы. Галоалкалолентные бактерии, выделенные из высокоминерализованной щелочной среды антропогенного происхождения (содового шламоохранилища), могут быть перспективными продуцентами ферментов для производства моющих средств, переработки биогенного сырья, отходов пищевой промышленности и сельского хозяйства.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/507, идентификация штаммов выполнена в рамках темы “Поиск и селекция новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии. Создание иммунохимических диагностических систем”, номер государственной регистрации НИОКТР 122010800029-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Безбородов А.М., Загустина Н.А. Липазы в реакциях катализа в органическом синтезе (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 4. С. 347–373.
- Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г., Кузнецова М.В., Олонцев В.Ф., Демаков В.А. Иммобилизация на углеродных сорбентах клеток штамма *Rhodococcus ruber* gt1, обладающего нитрилгидратазной активностью // Прикладная биохимия и микробиология. Т.43. № 2. 2007. С. 193–198.
- Шеламова С.А., Тырсин Ю.А. Индукция биосинтеза липаз микромицетом. Вестник ОГУ. 2012. № 1(137). С. 172–176.
- Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Выделение и идентификация алкалолентных бактерий с гидролитической активностью из содового шламоохранилища // Микробиология. 2021. Т. 90. № 2. С. 155–165.
- Akkaya B., Yenidunya A.F., Akkaya R. Production and immobilization of a novel thermoalkalophilic extracellular amylase from bacilli isolate // Int. J. Biol. Macromol. 2012. V. 50. P. 991–995.
- Amoah J., Ho S.-H., Hama S., Yoshida A., Nakanishi A., Hasunuma T., Ogino C., Kondo A. Converting oils high in phospholipids to biodiesel using immobilized *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalysts expressing *Fusarium heterosporum* lipase // Biochem. Eng. J. 2016. V. 105. P. 10–15.
- Arumugam A., Ponnusami V. Biodiesel production from *Calliphylum inophyllum* oil using lipase producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within reticulated foams // Renewable Energy. 2014. V. 64. P. 276–282.
- Bajaj A., Lohan P., Jha P.N., Mehrotra R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. V. 62. P. 9–14.
- Bulow L., Mosbach K. The expression in *E. coli* of a polymeric gene coding for an esterase mimic catalyzing the hydrolysis of p-nitrophenyl esters // FEBS Lett. 1987. V. 210. P. 147–152.
- DasSarma S., DasSarma P. Halophiles and their enzymes: Negativity put to good use // Curr. Opin. Microbiol. 2015. V. 25. P. 120–126.
- Eş I., Vieira J.D.G., Amaral A.C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. P. 2065–2082.

- Ferrarezi A.L., Ohe T.H.K., Borges J.P., Brito R.R., Siqueira M.R., Vendramini P.H., Quilles Jr.J.C., Nunes C. da C.C., Bonilla-Rodriguez G.O., Boscolo M., Da-Silva R., Gomes E.* Production and characterization of lipases and immobilization of whole cell of the thermophilic *Thermomucor indicae seudaticae* N31 for transesterification reaction // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2014. V. 107. P. 106–113.
- Fujinami S., Fujisawa M.* Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes – past, present and future // *Environ. Technol.* 2010. V. 31(8–9). P. 845–856.
- Gen Q., Wang Q., Chi Z.-M.* Direct conversion of cassava starch into single cell oil by co-cultures of the oleaginous yeast *Rhodospidium toruloides* and immobilized amylase-producing yeast *Saccharomycopsis fibuligera* // *Renewable Energy.* 2014. V. 62. P. 522–526.
- Grbavčić S.Ž., Dimitrijević–Branković S.I., Bezbradica D.I., Šiler–Marinković S.S., Knežević Z.D.* Effect of fermentation conditions on lipase production by *Candida utilis* // *J. Serb. Chem. Soc.* 2007. V. 72(8–9). P. 757–765.
- Guldhe A., Singh P., Kumari S., Rawat I., Permaul K., Bux F.* Biodiesel synthesis from microalgae using immobilized *Aspergillus niger* whole cell lipase biocatalyst // *Renewable Energy.* 2016. V. 85. P. 1002–1010.
- Gupta G.N., Srivastava S., Khare S.K., Prakash V.* Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment // *Int. J. Agriculture, Environment & Biotechnol.* 2014. V. 7(2). P. 371–380.
- Hama S., Yamaji H., Fukumizu T., Numata T., Tamalampudi S., Kondo A., Noda H., Fukuda H.* Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles // *Biochem. Eng. J.* 2007. V. 34. P. 273–278.
- Hemachander C., Bose N., Puvanakrishnan R.* Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production // *Process Biochem.* 2001. V. 36. P. 629–633.
- Khanpanuek S., Lunprom S., Reungsang A., Salakkam A.* Repeated-batch simultaneous saccharification and fermentation of cassava pulp for ethanol production using amylases and *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on bacterial cellulose // *Biochem. Eng. J.* 2022. V. 177. 108258.
- Koda R., Numata T., Hama S., Tamalampudi S., Nakashima K., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., Kondo A.* Ethanolysis of rapeseed oil to produce biodiesel fuel catalyzed by *Fusarium heterosporum* lipase-expressing fungus immobilized whole-cell biocatalysts // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2010. V. 66. P. 101–104.
- Krulwich T.A., Liu J., Morino M., Fujisawa M., Ito M., Hicks D.B.* Adaptive mechanisms of extreme alkaliphiles / In book: *Extremophiles Handbook*. Ed. K. Horikoshi. Springer, 2011. P. 119–139.
- Kumar S., Karan R., Kapoor S., Singh S.P., Khare S.K.* Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes // *Brazil. J. Microbiol.* 2012. V. 43(4). P. 1595–1603.
- López-Fernández J., Benaiges M.D., Valero F.* Second- and third-generation biodiesel production with immobilised recombinant *Rhizopus oryzae* lipase: Influence of the support, substrate acidity and bioprocess scale-up // *Biores. Technol.* 2021. V. 334. 125233
- Mageswari A., Subramanian P., Chandrasekaran S., Sivasanmugam K., Babu S., Gothandam K.M.* Optimization and immobilization of amylase obtained from halotolerant bacteria isolated from solar salterns // *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2012. V. 10. P. 201–208.
- Oda M., Kaieda M., Hama S., Yamaji H., Kondo A., Izumoto E., Fukuda H.* Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production // *Biochem. Eng. J.* 2005. V. 23. P. 45–51.
- Oliveira A.F., Bastos R.G., de la Torre L.G.* *Bacillus subtilis* immobilization in alginate microfluidic-based micro-particles aiming to improve lipase productivity // *Biochem. Eng. J.* 2019. V. 143. P. 110–120.
- Rakchai N., H-Kittikun A., Zimmermann W.* The production of immobilized whole-cell lipase from *Aspergillus niger* ST57 and the enhancement of the synthesis of fatty acid methyl esters using a two-step reaction // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2016. V. 133. S128–S136.
- Sarethy I.P., Saxena Y., Kapoor A., Sharma M., Sharma S.K., Gupta V., Gupta S.* Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 38. P. 769–790.
- Surendhiran D., Vijay M., Sirajunnisa A.R.* Biodiesel production from marine microalga *Chlorella salina* using whole cell yeast immobilized on sugarcane bagasse // *J. Environ. Chem. Eng.* 2014. V. 2(3). P. 1294–1300.
- Tamalampudi S., Talukder M.R., Hama S., Numata T., Kondo A., Fukuda H.* Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst // *Biochem. Eng. J.* 2008. V. 39. P. 185–189.
- Taskin M., Ucar M.H., Unver Y., Kara A.A., Ozdemir M., Ortucu S.* Lipase production with free and immobilized cells of cold-adapted yeast *Rhodotorula glutinis* HL25 // *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2016. V. 8. P. 97–103.
- Verma N.K., Raghav N.* Comparative study of covalent and hydrophobic interactions for α -amylase immobilization on cellulose derivatives // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 174. P. 134–143.
- Zaitsev S.Yu., Savina A.A., Zaitsev I.S.* Biochemical aspects of lipase immobilization at polysaccharides for biotechnology // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2019. V. 272. 102016.
- Zhang L.Y., Wei D.Z., Tong W.Y.* Effective inducers for lipase production by *Candida rugosa* // *Ann. Microbiol.* 2003. V. 53(4). P. 499–504.

Physiological and Biochemical Characteristics, and Biotechnological Potential of Hydrolitic Haloalkalitolerant Bacteria of Soda Sludge Storage

Yu. G. Maksimova^{1, 2, #}, A. V. Shilova¹, V. V. Egorova¹, V. A. Shchetko³, and A. Yu. Maksimov^{1, 2}

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Golev str., 13, Perm, 614081 Russia

² Perm State University, Bukirev str., 15, Perm, 614990 Russia

³ Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences, Kuprevich str., 2, Minsk, 220141 Belarus

#e-mail: maks@iegm.ru

Peculiarities of manifestation of hydrolytic activity of haloalkalitolerant bacteria *Pseudomonas peli* 3-T, *Microbacterium kitamiense* 16-DB, and *Bacillus aequororis* 5-DB, isolated from the soil of the territory of the soda sludge storage and the soda sludge of the functioning sludge reservoir of Berezniki Soda Plant (Perm Territory, Russia) were studied. It was shown that the maximum activity of extracellular lipases and amylases of the three studied bacteria were manifested at pH 11 and a high concentration of sodium chloride (50–200 g/L). Cultivation of *P. peli* 3-T on a mineral medium with 0.5% glycerol (source of carbon) and 0.03% urea (source of nitrogen) makes it possible to obtain biomass (6.9 g/L) and activity of extracellular lipase (1.26 U/L) and lipase associated with cells (3.02 U/mg dry cells) with a high economic ratio of substrate consumption (138%). The efficiency of immobilization of *P. peli* 3-T and *B. aequororis* 5-DB cells for use in lipid and starch biotransformation was shown. *P. peli* 3-T cells immobilized by adsorption on kaolin and incorporated into the structure of barium alginate and agarose gels retained from 40.4 to 63.8% of the cell lipase activity in suspension. *B. aequororis* 5-DB cells immobilized by adsorption on kaolin retained 42.5% of lipase and 90.7% of amylase activity as compared to the initial ones. At the same time, the activities of the *P. peli* 3-T and *B. aequororis* 5-DB enzymes were preserved during 6 consecutive reactions. The amylase activity of immobilized *M. kitamiense* 16-DB cells by adsorption on kaolin and chitosan decreased to 2.7–3.5% of the initial value and was completely inhibited upon immobilization by cell's entrapment into barium alginate gels or agarose gels.

Keywords: amylase, lipase, cultivation, immobilization of bacterial cells, halotolerant bacteria, alkalitolerant bacteria