



**ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ**



Катедра „Биохимия и микробиология“

Йордан Методиев Стефанов

**ЕКЗОЕНЗИМИ, ПРОДУЦИРАНИ ОТ ЩАМОВЕ НА РОД *VACILLUS* –
МИКРОБИОЛОГИЧНИ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ
И БИОТЕХНОЛОГИЧНИ АСПЕКТИ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“
по докторска програма „Микробиология“,
Професионално направление 4.3 Биологически науки

Научен ръководител: доц. д-р Соня Костадинова

**ПЛОВДИВ
2020**

Дисертационният труд съдържа 150 страници на формат А4, 10 таблици и 46 фигури. В библиографската справка са включени 376 заглавия на латиница. Експерименталната работа е извършена в лабораториите на катедра „Биохимия и микробиология“ на ПУ „Паисий Хилендарски“, ул. „Костаки Пеев“ № 21.

Дисертационният труд е обсъден на разширено заседание на катедра „Биохимия и микробиология“ към Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“, проведено на 26.11.2019 г.

Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 25.02.2020 г. от 13 часа в зала „Компас“ на ПУ „Паисий Хилендарски“ (гр. Пловдив, ул. „Цар Асен“ № 24).

Материалите по защитата са предоставени за свободен достъп на интересуващите се в библиотеката на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Научно жури:

проф. дбн Искра Витанова Иванова
проф. д-р Пенка Ангелова Мончева
доц.д-р Георги Тодоров Добрев
проф. д-р Илия Николов Илиев
доц. д-р Соня Костадинова Трифонова

Изказвам най-сърдечни благодарности на първо място на научния си ръководител доц. д-р Соня Костадинова за предоставените възможности да придобия нови знания и умения, за търпеливостта и насоките, които получих по време на работата върху дисертационния си труд.

Благодаря и на проф. д-р Велизар Гочев, гл. ас. д-р Мариана Мърхова, гл. ас. д-р Иван Илиев, гл. ас. д-р Таня Гирова за професионалната помощ и приятелските съвети, предоставени във всеки момент на нужда.

Благодаря на колегите от секция „Биохимия“ към катедра „Биохимия и микробиология“, ПУ „Паисий Хилендарски“ и на колегите от катедра „Биохимия и молекулярна биология“ към Университет по хранителни технологии, Пловдив за указаната помощ.

Благодаря и на семейството за търпението, подкрепата, съпричастността и помощта през изминалите години.

ВЪВЕДЕНИЕ

Бурното икономическо развитие на световната общност изправя човечеството пред два основни проблема – да се ускори и разнообрази индустриалното производство на блага и в същото време да се намали отпечатъка върху околната среда, който индустриалното производство оставя. Едно от решенията е използването на биологични катализатори (ензими), които провеждат различни реакции при меки условия и без големи разходи на енергия. Те гарантират намалено количество на употребявани токсични вещества, висока селективност на осъществяваните реакции, улеснено пречистване на получените продукти, намаляване на технологичните етапи, по-високо качество на крайния продукт и по-слабо замърсяване на средата. Множество производства заменят стари технологии, в които преобладават тежки химични процеси с етапи с биологични катализатори. Някои от тези сфери са производство на храни, фуражи, перилни и почистващи препарати, текстил, фармацевтични продукти, козметика и фина химия. Осемдесет процента от световния пазар на ензими обслужва тези направления (Van Oort et al., 2010).

Нуждата от индустриални биокатализатори постоянно се увеличава поради внедряването на устойчиви решения в производствата. Според някои изследователи това ще се отрази на световния пазар със стабилно нарастване от 6.9% годишно – от 5.8 до 11.3 милиарда долара в периода 2010 – 2020 година. Най-голямо търсене на ензимни препарати има в Северна Америка (45%), Западна Европа (21.2%) и Азия (18.8%) (CRISIL, 2013). Пазарът на Източна Европа се оценява на 4 – 5%. Според анализите най-голямо приложение има в секторите „храни и напитки“ (40%), както и „фуражи“ – над 20%. Сегментът „фуражи“ ще е най-бурно развиващият се в споменатия 10 годишен период с ръст от 8.4%, който ще е следван от „храни и напитки“ с годишен ръст от 7.5%. Производството на „битова химия и козметика“ ще заема 25% от пазара, а „биоенергетика“ – 15% (CRISIL, 2013).

Ръстът в сегмента „специални ензими“, разделен на 4 части – фармация, изследвания и биотехнологии, биокатализа и диагностика, ще достигне 840 милиона долара до 2020 година. Двигателят е навлизащата тенденция по прилагане на превантивна и персонализирана медицина, както и широкото използване на различните технологии за секвениране на геноми (CRISIL, 2013).

Перспективите за създаване нови ензимни продукти и подобряване на характеристиките на съществуващите са насочени към микроорганизмите, като сред бактериите водеща роля имат видовете на род *Bacillus*, използвани като продуценти на редица ензими (Declerck et al., 2003). Микроорганизмите са предпочитани пред растителните и животински източници, тъй като производството на микробиални ензими е по-евтино, по-лесно контролируемо и надеждно (Burhan et al., 2003).

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основна цел на настоящия дисертационен труд е **изследване на продукцията на екстрацелуларни ензими от видове на род *Bacillus* с потенциал за биотехнологично приложение.**

За осъществяването на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Скрининг на щамове от род *Bacillus* за продукция на екстрацелуларни ензими.
2. Оптимизиране на културалните условия за биосинтез на ензимите – състав на хранителните среди; ефект на микроелементи, време за култивиране, обем на посевния материал.
3. Пречистване на ензимите.
4. Характеристика на някои свойства на пречистените ензими.
5. Молекулярно-биологично изследване на гени, кодиращи екстрацелуларни ензими при видове *Bacillus*.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Щамове

В настоящата дисертация са изследвани 166 щама от род *Bacillus* от бактериалната колекция на секция „Микробиология“ към катедра „Биохимия и микробиология“.

2. Хранителни среди

- Основна среда за синтез на амилалитични ензими (g/l): разтворимо нишесте – 10; Na_2HPO_4 – 2.5; пептон – 2; KH_2PO_4 – 1; NaCl – 1; глюкоза – 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.05; CaCl_2 – 0.05; pH 7.0. Средата се стерилизира при 15 min 121°C.
- Основна среда за синтез на протеолитични ензими (g/l): казеинов хидролизат – 5.5; бактопептон – 5; глюкоза – 5; Na_2CO_3 – 5; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 2; pH 8.0. Средата се стерилизира 15 min при 121°C.
- Среда на Герасимене и сътр. (1980)(g/l): казеинов хидролизат – 10; бактопептон – 10; NaCl – 5; глюкоза – 4; NaHCO_3 – 3; Na_2HPO_4 – 0.4; ZnCl_2 – 0.01; pH 7.0. Средата се стерилизира 15 min при 121°C.

3. Културални методи

3.1. Периодично култивиране в колби. Проведено е в Ерленмайерови колби със съответната течна хранителна среда, с обем 10% от обема на колбата. Щамовете са култивирани на ротационна, термостатирана клатачка Lab Companion IST-4075 (Jeio Tech, South Korea), при скорост 100 rpm и оптимална температура.

3.2. Периодично култивиране в биореактор. Извършено е в биореактор Minifors (Infors AG, Switzerland) в продължение на 24 часа при 37°C, без насищане с кислород, но с разбъркване, със скорост на бъркалката от 100 rpm.

3.3. Оптимизация на културалните условия за ензимен синтез. Оптимизацията на състава на хранителните среди е направена чрез изпитване на ефекта на различни въглеродни източници (глюкоза, фруктоза, рибоза, маноза,

малтоза) в концентрация от 0.05 до 1%, съответно; източници на азот (казеинов хидролизат, дрождев екстракт, говежди екстракт, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ във вариращи концентрации; метални йони (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+}) в концентрация 1 mM.

Ефектът на концентрацията на инокулума е определен чрез инокулиране на съответната хранителна среда с вариращи обеми стандартизирана субкултура – от 1 до 10%.

За определяне динамиката на ензимната активност и клетъчния растеж от културалната среда са вземани проби по 10 ml на всеки два часа до 48^я час. В пробите са определени бактериална плътност, ензимна активност и рН.

Всички анализи са извършени в необходимия брой повторения, а данните са анализирани с ANOVA (StatisticaTM).

4. Ензимни реакции

4.1. Определяне на амилолитична активност (Bernfeld, 1955). Реакционната смес съдържа 1 ml разтвор на нишесте и 1 ml подходящо разрежена проба (ензим). Реакцията се инкубира 3 min при 20°C. Като контрола се използва неинкубирана проба. Добавя се 1 ml 3,5-ДНСК. Пробите се поставят в кипяща водна баня за 15 min; охлаждат се и към тях се добавят 9 ml dH₂O. Абсорбцията на пробите се измерва спектрофотометрично при дължина на вълната $\lambda = 540 \text{ nm}$.

За една ензимна единица се приема количеството ензим, което катализира хидролизата и отделянето на 1 mg малтоза от субстрата за 3 min при рН 6.9 и температура 20°C.

4.2. Определяне на протеолитична активност (Cupp-Enyard, 2008). Реакционната смес съдържа 5 ml разтвор на казеин и 1 ml подходящо разреден ензим. Реакцията се инкубира 10 min при 37°C, след което се спира с добавянето на 5 ml 110 mM трихлороцетна киселина и се инкубира повторно за 30 min при 37°C, за утаяване на нехидролизираните протеини. Като контрола се използва неинкубирана проба. Следва центрофугиране при 4°C, 12 000 rpm за 20 min. В епруветка се нанасят 2 ml от супернатантата, 5 ml 500 mM Na₂CO₃ и 1 ml 500 mM реагент на Фолин. Реакцията се провежда 30 min при 37°C. Абсорбцията на пробите се измерва спектрофотометрично при дължина на вълната $\lambda = 660 \text{ nm}$.

Протеолитичната активност е равна на количеството освободен тирозин от субстрата за 1 min.

4.3. Определяне на фосфолипаза С (Takahashi et al., 1981). Реакционната смес съдържа 0.2 ml L- α -фосфатидилхолин, 200 μl 0.2 M Borax-HCl, рН 7.2 и 100 μl подходящо разреден ензим. След инкубиране за 10 до 30 min при 37°C реакцията се прекъсва с 0.1 ml 60% разтвор на HClO₄ и реакционните продукти се екстрахират 60 sec на Vortex-хомогенизатор с 2.5 ml екстракционна смес (хлороформ:метанол:HCl/66:33:1). След центрофугиране (10 min при 2000 rpm) за разделяне на слоевете, аликвотни части по 0.2 ml от горния метанол-воден слой се подлагат на хидролиза с 0.7 ml 60% разтвор на HClO₄ (80 min при 170°C). Към пробите се прибавят по 3 ml бидестилирана H₂O и се третираат 10 min на 100°C. След охлаждане, се добавят по 0.5 ml 2.5% разтвор на амониев молибдат, 0.05 ml 1% разтвор на Triton x100 и 1 ml бидестилирана H₂O. Отделилият се при киселинната хидролиза на фосфорилхолина неорганичен фосфат образува с амониевия молибдат и Triton x 100 комплекс, който се мери

спектрофотометрично след 35 – 40 min на 510 nm. Като контрола се използва проба с нулево време за инкубация.

Една единица фосфолипаза С е количеството ензим, което освобождава 1 μmol фосфатидилхолин за 1 min, при специфичните условия на действието на ензима.

5. Методи за пречистване на ензимите

Биомасата е отделена от културалната среда чрез центрофугиране при 10 000 rpm, 4°C, за 20 min.

5.1. Методи за концентриране. Приложени са различни методи за концентриране на културалната супернатанта:

- Ультрафилтрация с аргон (0.5 atm) чрез системата Amicon® Stirred Cells (MilliporeSigma, USA) и мембранни филтри с големина на порите от 10 kDa;
- Ультрафилтрация чрез центрофугиране в епруветки Amicon Ultra-15 (MilliporeSigma, USA) с големина на порите от 10 kDa;
- Изсолване чрез амониев сулфат до 70, 80, 90%, насищане, съответно;
- Утаяване с 2.5 обема ацетон.

5.2. Хроматографски техники за пречистване

Гел-филтрация. Проведена е на хроматографска колона (94 x 2.5 cm) със Sephadex G75 в 0.05M Tris-HCl, pH 7.8. Събирани са фракции по 7 ml със скорост 15 ml/h. Фракциите са анализирани за белтък и фосфолипазна С активност.

FPLC. Ензимен препарат на фосфолипаза С (след молекулно-ситова хроматография) е подложен на анионообменна хроматография чрез FPLC система АКТА Prime Plus (GE Healthcare, USA) и колона HiPrep DEAE FF 16/10 (GE Healthcare, USA), запълнена с DEAE Sepharose Fast Flow и уравновесена с 0.025 M Tris-HCl, с pH 8.0. Събрани са 90 фракции с обем по 3 ml, със скорост на потока 18 ml/h. Приложен е градиент 0-1 M NaCl в 0.025 M Tris-HCl, pH 8.0 буфер. Системата използва UV детектор (UPC-900) за отчитане на наличните протеини и автоматичен колектор на фракции (Frac-920). Данните от хроматографските анализи са обработени от софтуер Unicorn Control Software (GE Healthcare).

6. Денатурираща SDS-PAGE електрофореза

Предварително се приготвя денатуриращ гел, състоящ се от 4% концентриращ гел и 10% разделящ гел. Към 50 μl подходящо разрежена белтъчна проба или протеинов маркер се прибавят 10 μl денатурираща смес. Пробите се инкубират за 90 sec на кипяща водна баня, а след това веднага се пренасят в ледена водна баня. Денатурираните белтъчни проби се нанасят в пригответените гелове, които са потопени в running buffer. Електрофорезата протича при 4°C, 100 V. Геловите предварително се оцветяват с разтвора за оцветяване за 60 min, след което се обезцветяват с разтвор за обезцветяване при постоянно разклащане. Разтворът за обезцветяване се сменя периодично докато не се появят видими бендове.

7. Молекулярно-биологични методи

7.1. Изолиране на хромозомна ДНК (Ausubel et al., 1987). За утаяване на клетките, 1 ml от културалната течност се центрофугира при 14 000 rpm за 10 min. Утаените клетки се ресуспендират в 1/10 от първоначалния обем Milli-Q вода. Добавят се 50 µl SE буфер, 200 µl dH₂O, 1 mg лизозим. Пробата се инкубира при 37°C за 1 час. Възстановява се изходната йонна сила на SE буфера чрез добавяне на 30 µl 1M NaCl и 4.6 µl EDTA. Към пробата се прибавя 20% SDS (NaC₁₂H₂₅SO₄) до крайна концентрация 1%. За ускоряване на лизиса, пробата се инкубира във водна баня при 50 – 60°C за 30 min като периодично се разбърква. Добавя се 5M NaClO₄ до крайна концентрация 1 M. Провежда се депротеинизация чрез добавяне на 500 µl хлороформ:изоамилов алкохол (24:1) и пробата се разбърква умерено в продължение на 30 min. Епруветките се центрофугират при 14 000 rpm, 4°C за 20 min. Внимателно се отпипетирва горния воден слой в чиста епруветка, като се внимава да не се засяга пелената от денатурирани протеини, която се намира между двете фази. Към водната фаза бавно се добавят 2 обема охладен 95% C₂H₅OH. Пробата се съхранява при –20°C за 24 часа, след което се центрофугира, а получената пелета се изсушава при стайни условия. ДНК се ресуспендира в 50 µl TE буфер.

7.2. Полимеразна верижна реакция (PCR). Качеството и количеството на геномната ДНК и изолираните фрагменти са установени чрез спектрофотометър BioPhotometer D30 на фирма Eppendorf с кювета с обем от 1 µl. Полимеразната верижна реакция е проведена в термосайкълър T100™ Thermal Cycler на фирма Bio-rad. Реакционната смес съдържа 25 µl DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo, USA), 19.5 µl ултрачиста вода, 3 µl ДНК, 2.5 µl праймери.

Условия на полимеразната реакция:

- Първоначална температура – 95°C за 5 min;
- 35 цикъла – 95°C за 60 sec; 50°C за 45 sec; 72°C за 90 sec;
- Финална елонгация – 72°C за 7 min;
- Задържане – 4°C.

7.3. Агарозна електофореза. Разделянето на амплифицираните ДНК фрагменти се осъществява чрез 2% агарозен TBE гел. Електофорезата протича във вана с 0.5x TBE буфер под напрежение от 70 V в продължение на 60 min.

7.4. Биоинформатични анализи. Идентифицирането на получените секвенции е осъществено чрез онлайн инструмента BLAST (basic local alignment search tool).

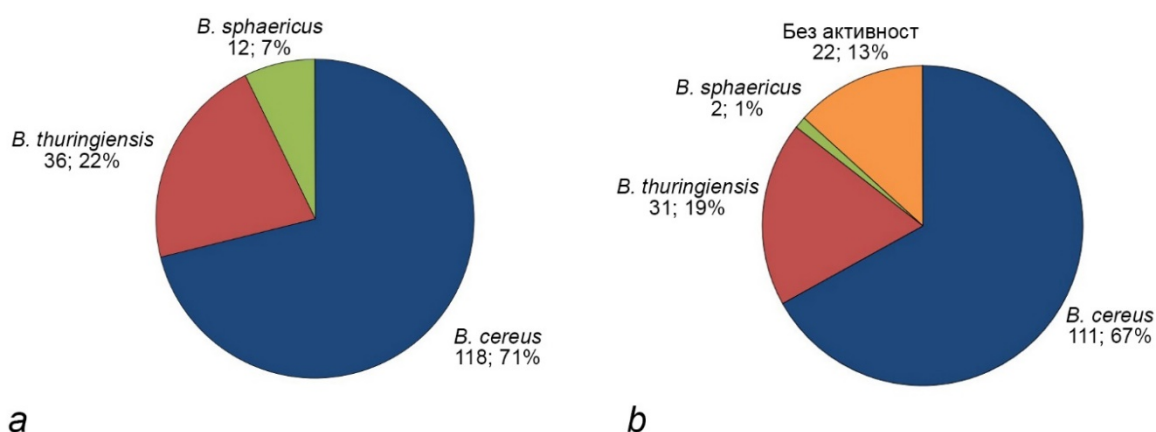
За сравняване с вече идентифицирани гени е използвана банката за гентична информация Genebank. С помощта на софтуер Geneious™ (Biomatters, Нова Зеландия), създадената база данни на гени за фосфолипаза C чрез Genebank и секвенирания ген, кодиращ фосфолипаза C от щам *Bacillus thuringiensis* № 17 е конструирано филогенетично дърво (дендрограма).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Скрининг на щамове *Bacillus* за продукцията на екзоензими

Сто шестдесет и шест щамове от род *Bacillus* са изследвани за продукцията на екстрацелуларни ензими. Видовото разпределение на щамовете е както следва: 118 щамове *Bacillus cereus*, 36 щамове *B. thuringiensis* и 12 щамове *B. sphaericus* (Фиг. 1a).

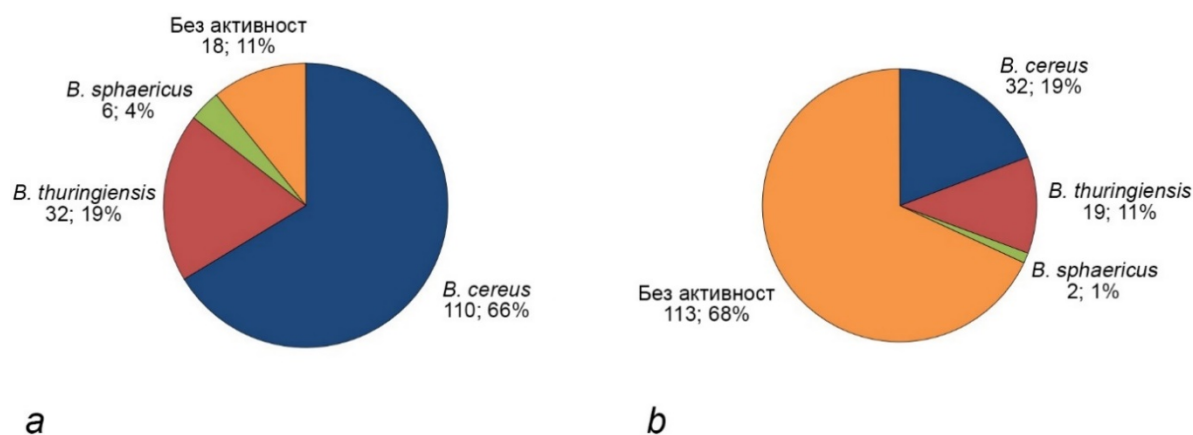
Първоначалният скрининг е извършен чрез качествени методи. Фосфолипазната активност е анализирана на лецитин-агар. Активността е висока при *B. cereus* и *B. thuringiensis*; положителна реакция е отчетена съответно при сто и единадесет щамове *B. cereus* и тридесет и един щамове *B. thuringiensis* (Фиг. 1b), докато само два щамове *B. sphaericus* проявяват активност.



Фигура 1. Видово разпределение на изследваните изолати (a); Щамове от род *Bacillus*, проявяващи фосфолипазна С активност (b)

Протеолитичната активност е определена на млечен агар и на хранителен желатин. Сто и десет щамове *B. cereus*, 32 щамове *B. thuringiensis* и 6 щамове *B. sphaericus* проявяват протеолитична активност (Фиг. 2a).

Амилолитична активност, доказана чрез хидролиза на скорбяла в агарова среда проявяват 31% от всички щамове, съответно, 32 щамове *B. cereus*, 19 щамове *B. thuringiensis* и 2 щамове *B. sphaericus* (Фиг. 2b).



Фигура 2. Протеолитична (a) и амилолитична (b) активност на щамове *Bacillus*

Положителна липазна активност проявяват 37% от всички изолати – 35 щама *B. cereus*, 18 щама *B. thuringiensis* и 8 щама *B. sphaericus*, а целулазна активност е отчетена само при 4% от анализиранияте щамове.

Извършен е корелационен анализ (*Pearson's correlation*) на показаните ензимни активности от всички изследвани щамове на род *Bacillus*, за да се установи дали съществува зависимост между тях. Резултатите от анализа показват, че се наблюдава статистически значима положителна корелация между фосфолипазната и протеазна активности, както и по-слаба, но значима положителна зависимост между продукцията на протеолитични и амилолитични ензими (Таблица 1). Значима отрицателна или положителна корелация между останалите изследвани ензими не се наблюдава. Данните показват, че ако един щам продуцира фосфолипаза, много е вероятно той да продуцира и екстрацелуларен протеолитичен ензим. И двата класа ензими се описват като фактори на патогенност при много микроорганизми, като е установено, че щамове, които продуцират и двата ензима са много по-вирулентни от останалите (Rossoni et al., 2013).

Таблица 1. Корелационна матрица на изследваните ензимни активности

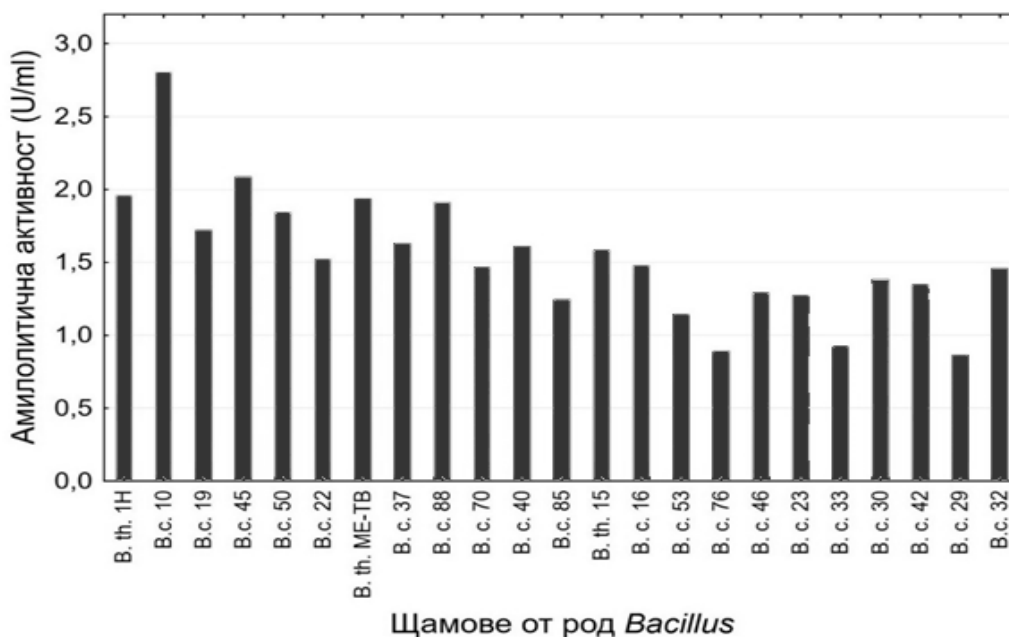
	Фосфолипазна	Липазна	Амилазна	Протеазна	Целулазна
Фосфолипазна	1				
Липазна	0.041858	1			
Амилазна	0.078909	0.091582	1		
Протеазна	0.277598*	0.053064	0.190448*	1	
Целулазна	0.076194	0.052437	0.005043	-0.04066	1

*Корелацията е значима при степен 0.1

Резултатите от проведения от нас първоначален скрининг показаха, че изследваните щамове *Bacillus* продуцират извънклетъчни ензими, преобладаващо фосфолипаза С и протеази. Потвърждават се литературните данни (Titball, 1993), според които видовете *B. cereus* и *B. thuringiensis* са сред най-активните бактериални продуценти на фосфолипаза С. Положителни за фосфолипазна С активност са 94% от тестваните щамове *B. cereus* и 86% от *B. thuringiensis*. Преобладаваща част от анализиранияте *B. cereus* и *B. thuringiensis* щамове проявяват и протеолитична активност, която е съпоставима, като процент на положителни проби, с фосфолипазната.

2. Амилолитични ензими

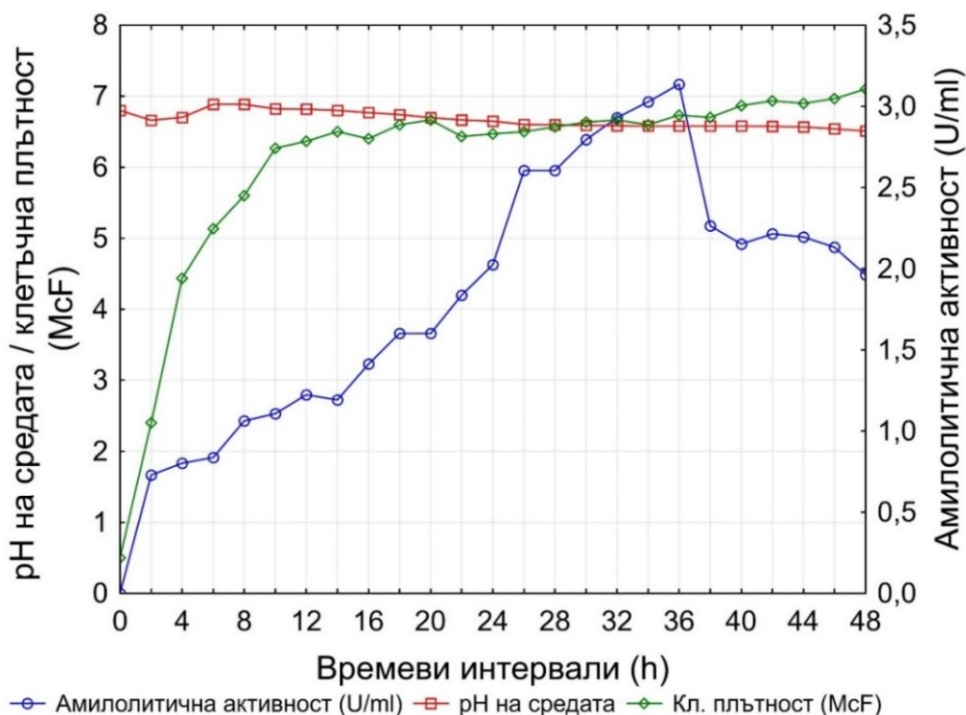
Амилолитичната активност на 23 щама, показали положителна реакция на агара със скорбяла (зона по-голяма от 5 mm), е изследвана количествено чрез определяне на редуциращи захари след ензимна хидролиза (Фиг. 3). Най-висока активност прояви щам *Bacillus cereus* № 10 (Фиг. 3), с който са проведени по-нататъшните изследвания. Активността в културалната среда – 2.8 U/ml е сравнима с тази, съобщена за *Bacillus subtilis* от Pavithra и сътр. (2014) и за *Bacillus licheniformis* от Divakaran и сътр. (2011).



Фигура 3. Амилолитична активност на щамове от род *Bacillus*. Резултатите са средни от минимум 3 повторения

2.1. Динамика на ензимната продукция

Продукцията на амилолитични ензими при *B. cereus* щам № 10 започва на втория час от култивирането и достига 1 U/ml на 8^{-я} час. Активността се запазва почти без промяна до 14^{-я} час, след което нараства до 1.6 U/ml на 20 – 22 час. Следва скокообразно повишаване на активността до 2.6 U/ml на 26 – 28 час и до 3.14 U/ml на 36^{-я} час, който бележи пикът на амилолитичната активност (Фиг. 4).



Фигура 4. Динамика на амилолитичната продукция на щам *Bacillus cereus* № 10. Резултатите са средни от минимум 3 повторения

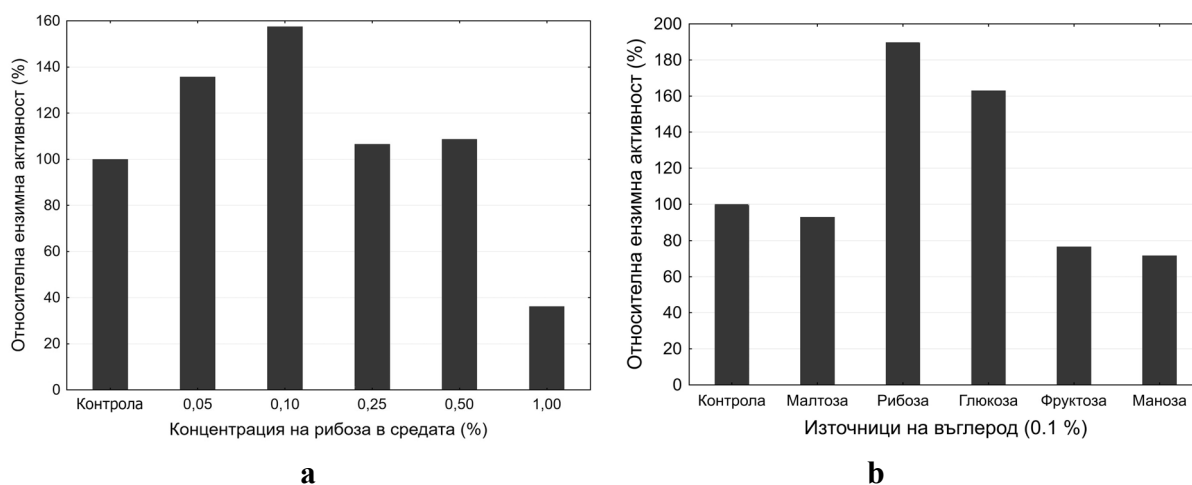
Продължителната ензимна продукция, наличието на 3 пата на активност (8 – 14 час, 20 – 22 час и 26 – 28 час) и запазването на относително високи нива на активност по време на култивирането, ни дава основание да предположим, че се секретират различни типове амилази в културалната среда по време на растежа. рН на средата се запазва относително постоянно, около неутрално, по време на култивирането. Пикът на ензимната активност се отчита при рН 6.6. Анализът на клетъчната плътност показва, че експоненциалната фаза започва на 2^{-я} час. Максимална ензимна продукция се наблюдава по време на късната стационарна фаза на растеж (Фиг. 4).

2.2. Ефект на състава на хранителната среда върху синтеза на амилолитични ензими

За определяне на ефекта на допълнителни въглеродни източници върху амилолитичната продукция, основната среда, съдържаща само разтворимо нишесте (контрола) е допълнително обогатена с фруктоза, глюкоза, рибоза и малтоза, съответно в концентрации от 0.1% (Фиг. 5а). Максимална амилолитична активност се наблюдава при добавяне на рибоза. Обогатяването на средата с глюкоза също води до повишаване на активността. Малтоза, фруктоза и маноза имат инхибиращ ефект върху ензимната продукция – активността е съответно 93%, 77% и 72% от тази на контролата.

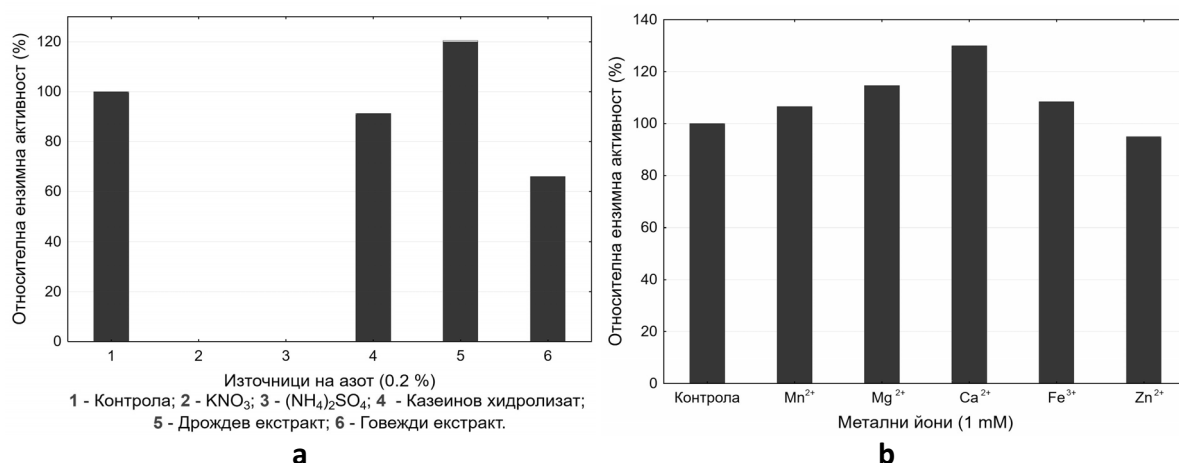
Установено е, че наличието на допълнителното количество екзогенно внесени нискомолекулни метаболити може да окаже инхибиращ ефект върху синтеза на ензими (Saito et al., 1975), но при изследвания от нас щам ефектът е стимулиращ. Този резултат може да бъде обяснен с факта, че бактериалната култура използва допълнителния източник на въглерод, за да ускори растежа си.

От значение е не само видът на вторичния въглероден източник, но и неговата концентрация в хранителната среда. Най-висока продукция – 157% в сравнение с контролата (без допълнителен източник на въглерод) се установи при добавяне на 0.1% рибоза в средата. Внасянето на по-високи или по-ниски концентрации води до редуция на амилолитичната продукция на щам, която е най-ниска при подхранване на средата с 1% рибоза (Фиг. 5b).



Фигура 5. Ефект на допълнителни въглеродни източници (а) и концентрацията на рибоза (б) върху продукцията на амилолитични ензими от *Bacillus cereus* № 10. Резултатите са средни от минимум 3 повторения

Проучени са ефектите от замяна на първоначалния азотен източник – пептон (контрола) с други органични и неорганични източници върху продукцията на амилазни ензими (Фиг. 6а). Установи се, че замяната на пептона с дрождев екстракт води до по-висока ензимна продукция. При влагането на казеинов хидролизат не се наблюдават статистически значими промени, а говеждият екстракт редуцира амилолитичната активност. Използването на неорганичен азотен източник, като NO_3^- и NH_4^+ , вместо органичен води до инхибиране на бактериалния растеж и ензимната продукция. Получените от нас резултати потвърждават наблюденията на други автори според които комплексните органични източници на азот в хранителната среда стимулират продукцията на амилолитични ензими (Thippeswamy et al., 2006). Органичните азотни източници вероятно не стимулират директно продукцията на ензими, а по-скоро ускоряват растежа на организмите в културалната среда (Srekanth et al., 2013). Дрождевият екстракт не само стимулира растежа, но може и да промени силно рН на културалната среда (Santos et al., 2003).



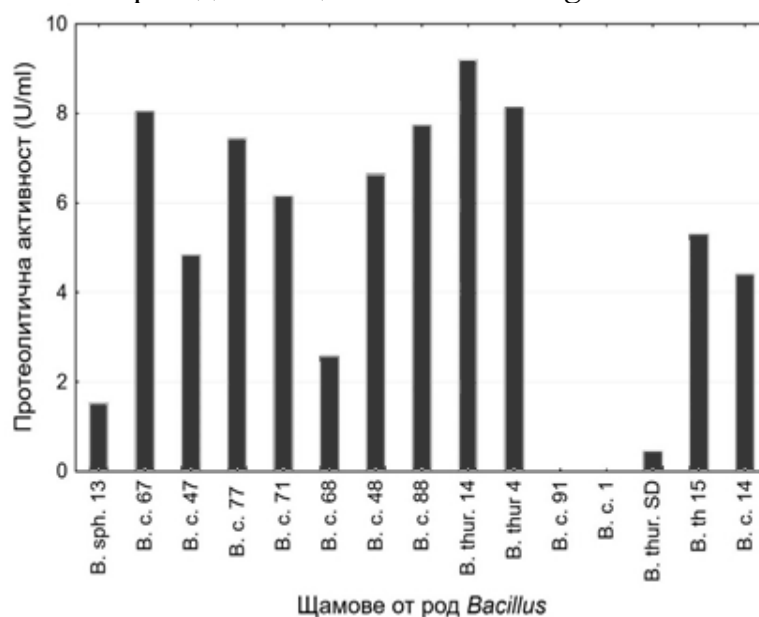
Фигура 6. Ефект на азотни източници (а) и метални йони (б) върху продукцията на амилолитични ензими от щам *Bacillus cereus* № 10. Резултатите са средни от минимум 3 повторения

Наличието на метални йони в хранителната среда оказва влияние върху ензимната продукция. Добавянето на Ca^{2+} в средата стимулира амилолитичната активност с 30% спрямо контролата (продукцията на среда без метални йони). Присъствието на цинкови йони има по-скоро инхибиращ ефект, а наличието на магнезиеви, манганови и железни йони не води до промени в амилазната продукция (Фиг. 6б). Повечето от изучените амилази са зависими от наличието на йони. Стимулирането на амилолитичната активност може да се дължи на взаимодействието между металните йони и отрицателно заредените аминокиселини в протеините. По-висока концентрация на метални йони изсолва хидрофобните аминокиселинни остатъци, което води към преминаване в една по-стабилна ензимна структура (Sudha et al., 2012). Металните йони могат да стимулират амилолитичната ензимна активност и изпълнявайки ролята на връзка между ензима и субстрата, като осигуряват стабилен контакт между активния център на ензима и молекулите на субстрата (Sudha et al., 2012).

В резултат на оптимизацията на състава на хранителната среда е постигнато увеличение на амилолитичната активност на щам *Bacillus cereus* № 10. При култивиране на оптимизираната среда (в състав, g/l: разтворимо нишесте – 10; Na₂HPO₄ – 2.5; дрождев екстракт – 2; KH₂PO₄ – 1; NaCl – 1; рибоза – 0.1; CaCl₂ – 1 mM, pH 7.0), амилолитичната активност е повишена до 4.29 ± 0.63 U/ml. Анализирането на динамиката на ензимната продукция, ни дава основание да предположим, че се секретират различни видове амилази в културалната среда по време на растежа.

3. Протеолитични ензими

Протеолитичната активност на щамовете, образували хидролизна зона върху млечния агар, по-голяма от 5 mm, е изследвана чрез определяне на количеството продуцирани свободни аминокиселини и малки пептиди след ензимна хидролиза. Изследвани са общо 15 щамове, култивирани при 37°C, в продължение на 14 часа. Най-висока извънклетъчна активност проявиха щамовете *Bacillus cereus* № 67 (8.04 U/ml), *B. cereus* № 88 (7.74 U/ml) и *Bacillus thuringiensis* № 14 (9.2 U/ml), (Фиг. 7). Тези резултати корелират с докладваните от други автори, които съобщават за протеолитична активност, варираща от 2.85 U/ml (Nabrdalik et al., 2010) до 20.67 U/ml (Badhe et al., 2016; Bhunia et al., 2011). По-нататъшните изследвания, свързани с оптимизация на условията за продукция и пречистване на ензима са проведени с щам *Bacillus thuringiensis* № 14.

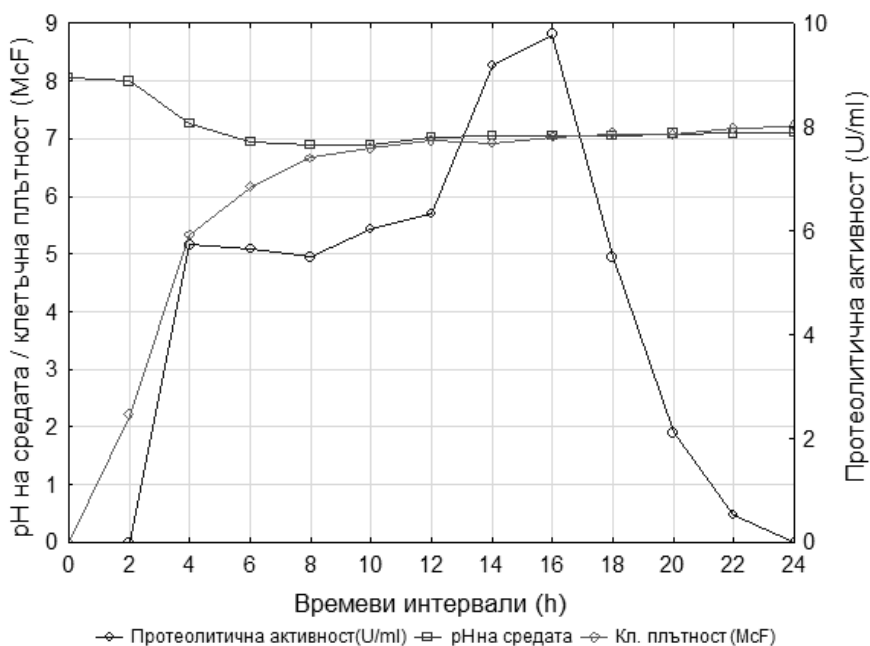


Фигура 7. Протеолитична активност на щамове от род *Bacillus*. Резултатите са средни от минимум 3 повторения

3.1. Динамика на протеолитичната продукция

Продукцията на протеолитични ензими при *Bacillus thuringiensis* щам № 14 започва скокообразно на 4^{-я} час от култивирането, когато в средата се отчитат приблизително 6 U/ml; тази активност се запазва до 12^{-я} час, след което рязко се покачва до 9.79 U/ml на 16^{-я} час (Фиг. 8). Културата се развива бурно още на 2^{-я} час. Експоненциалната фаза продължава до 8^{-я} час, след което културата навлиза в стационарна фаза, когато когато се отчита пик в протеолитичната продукция.

Независимо от присъствието на буфериращ агент в средата (Na_2CO_3), рН се понижава до 6.89 на 8-я час и се запазва неутрално до 24-я час.



Фигура 8. Динамика на продукцията на протеолитични ензими при щам *Bacillus thuringiensis* № 14. Резултатите са средни от минимум 3 повторения

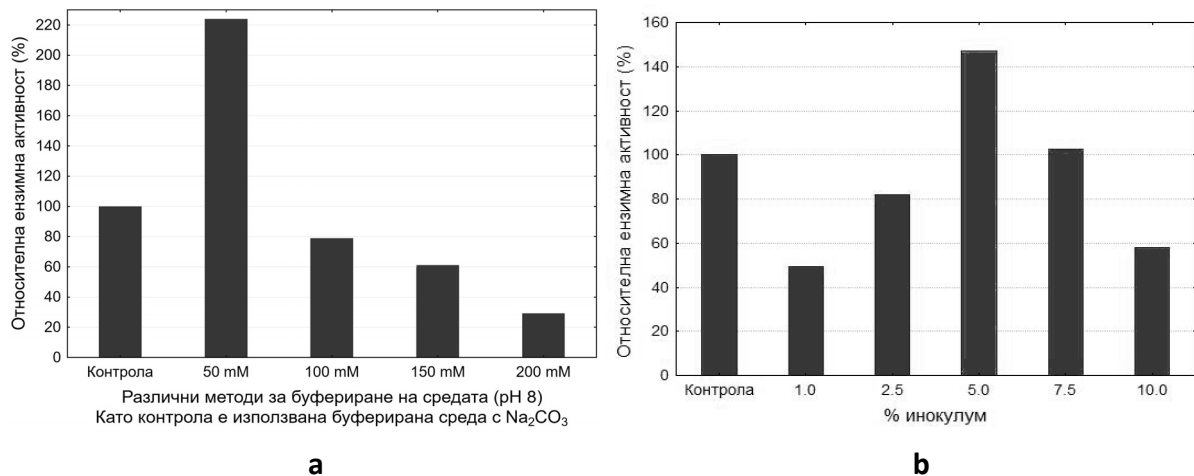
Оптималният период за култивиране при продукцията на протеолитични ензими е щам-специфично свойство и силно варира – от двадесет и четири до повече от четиридесет и осем часа; рН на културалната среда също може да варира от 6 до 11 (Contesini et al., 2017; Vadhe et al., 2016).

3.2. Ефект на състава на хранителната среда върху продукцията на протеолитични ензими

Един от най-важните компоненти на средата за продукцията на протеолитични ензими е буфериращия агент. Първоначално, използваната от нас среда е буферирана с 0.5% Na_2CO_3 , както е описано в литературата (Pant et al., 2015). По време на култивирането на *B. thuringiensis* № 14, се установи, че карбонатната буферираща система не е достатъчно добра за поддържане на постоянно рН. Карбонатната буферираща система образува неразтворими комплекси с някои от източниците на метални йони, а това потиска продукцията на протеолитични ензими. Като заместител на Na_2CO_3 е използван фосфатен буфер с варираща концентрация – от 50 mM до 200 mM, с рН 8.0. Най-висока протеолитична активност се отчете при буфериране на средата с 50 mM фосфатен буфер (Фиг. 9а). Активността в супернатантата се увеличава повече от 2 пъти: от 5.27 ± 0.73 U/ml на 11.8 ± 0.7 U/ml. Фосфатният буфер поддържа рН на средата непроменено (рН 8) и отново максимална ензимна продукция в културалната среда се отчита на 16-я час. С увеличаване на концентрацията на буфера, продукцията на протеолитични ензими значително намалява (Фиг. 9а).

Обемът на посевният материал е фактор от основно значение, защото създава баланс между бактериалната биомаса и достъпните ресурси в хранителната среда, който подsigурява оптимална ензимна продукция (Sandhya

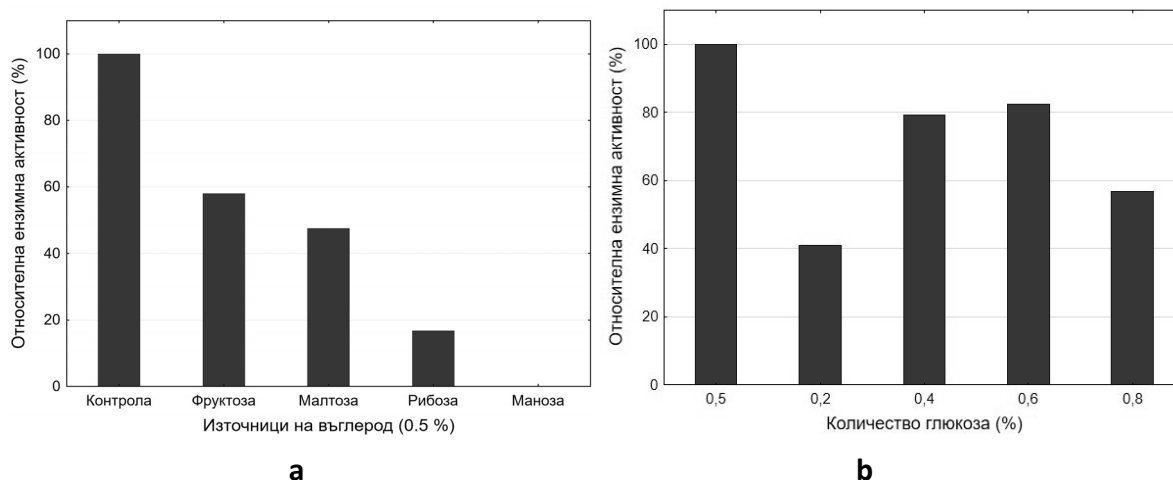
et al., 2005). За да се установи оптималната концентрация на посевния материал, хранителната среда е инокулирана с нарастващ обем инокулум (1 – 10%) с клетъчна плътност от 6.0 McF. Като контрола е използвана среда с 3.3% инокулум с 6.0 McF (количество, което е прилагано в предходни изследвания). Резултатите показват, че най-висока ензимна продукция се постига с 5% инокулум. Когато използваното количество инокулум е по-малко или по-голямо от 5%, изследваният шам продуцира по-малки количества протеолитични ензими (Фиг. 9b).



Фигура 9. Ефект на буферизация агент (а) и на обема на инокулума (б) върху продукцията на протеолитични ензими от *Bacillus thuringiensis* № 14. Резултатите са средни от минимум 3 повторения

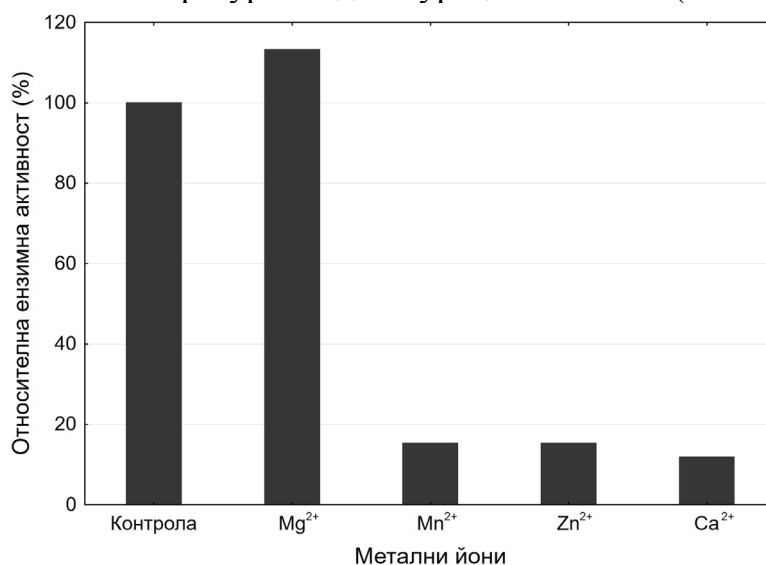
Abusham и сътр. (2009) и George-Okafor и сътр. (2012) съобщават за идентични резултати, за което има две обяснения. В първия случай, това може да се дължи на недостатъчен брой активни клетки на шам-продуцента, а във втория случай, когато клетъчната плътност е твърде голяма, съотношението на свободната повърхност към обема на културата се редуцира, което води до понижен ензимен синтез.

За установяване на ефекта на въглеродния източник върху протеолитичния синтез, шам *B. thuringiensis* № 14 е култивиран в среди, съдържащи фруктоза, малтоза, рибоза, маноза, съответно в концентрация от 0.5%. Като контрола е използвана среда с 0.5% глюкоза. Най-висока активност се установи в контролната среда съдържаща глюкоза. Замяната на глюкозата с другите въглехидрати води до понижаване на протеолитична активност, съответно с 42%, 53% и 83% при фруктоза, малтоза, рибоза. В средата съдържаща маноза, ензимна активност не се отчита, независимо от наличието на растеж (Фиг. 10a). Това може да се дължи на липсата на някои ключови ензими, което предотвратява разграждането на маноза, а шамът се развива за сметка на наличния пептон в средата. В същото време високото количество на неусвоими нискомолекулни въглехидрати инхибира синтеза на протеази (Kole et al., 1988). Установено е, че оптималната концентрация на глюкоза в средата е 0.5% (10b).



Фигура 10. Ефект на въглеродни източници (а) и на концентрацията на глюкоза (б) върху продукцията на протеолитични ензими от щам *Bacillus thuringiensis* № 14. Контролата е активността, отчетена на среда с 0.5% глюкоза. Резултатите са средни от минимум 3 повторения

Експресията на протеази и тяхната активност са зависими от присъствието на метални йони в хранителната среда (Adinarayana et al., 2003). За да се оцени ефекта на метални йони върху екстрацелуларна протеазна продукция на щам *B. thuringiensis* № 14, към хранителната среда са добавени, съответно $MgSO_4$, $MnSO_4$, $ZnCl_2$, $CaCl_2$, в концентрация 1 mM ефект (Фиг. 11). Добавянето на магнезиеви йони повиши ензимната активност с 13.3%, докато мангановите, цинковите и калциевите йони имаха по-скоро инхибиращ ефект. Наличието на двувалентни йони в хранителната среда е от изключително значение за постигане на високи ензимни активности. Йоните не само имат стимулиращо действие върху металопротеазите, но те правят ензимите много по-стабилни при излагане на стресови условия на средата. При високи температури металните йони подsigуряват поддържането на активна и стабилна конформация на протеина, при което температурната денатурация се забавя (Kumar et al., 2002).



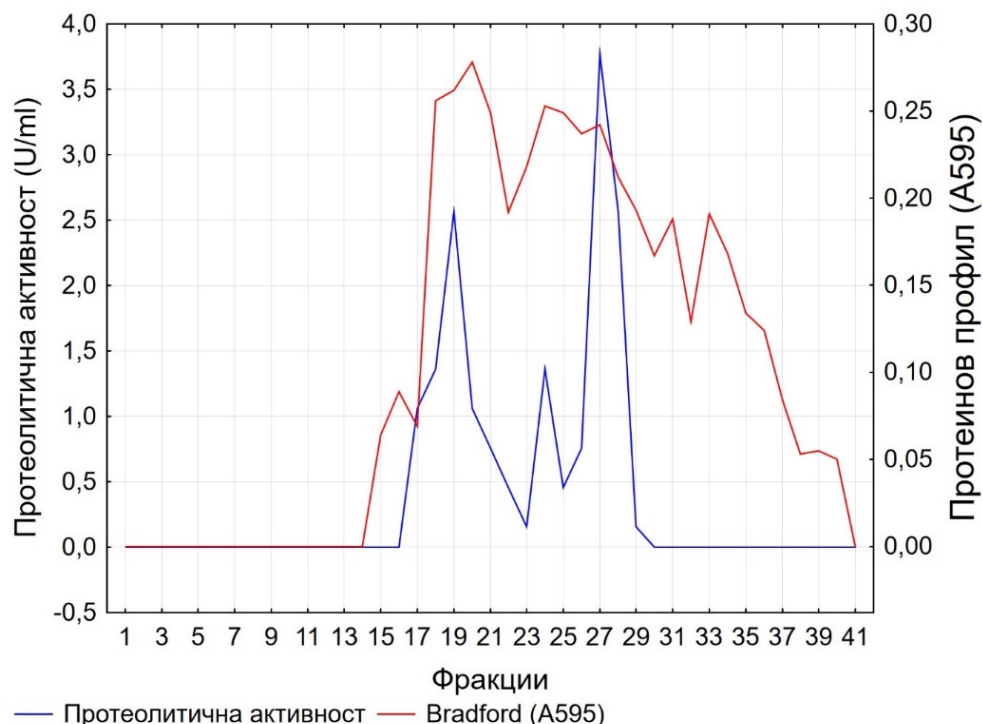
Фигура 11. Влияние на метални йони върху продукцията на протеолитични ензими от *Bacillus thuringiensis* № 14. Резултатите са средни от минимум 3 повторения

В резултат на проведените изследвания е оптимизиран състава на хранителната среда за култивиране на *B. thuringiensis* № 14, както следва (g/l): 50 mM фосфатен буфер – Na_2HPO_4 – 7.69, NaH_2PO_4 – 0.48; казеинов хидролизат – 5.5; бактопептон – 5; глюкоза – 5; MgSO_4 – 1 mM, pH 8. На тази среда, след 16 часа култивиране извънклетъчната протеолитична активност достигна 15.76 ± 2.33 U/ml.

3.3. Частично пречистване на протеолитични ензими от *Bacillus thuringiensis* щам № 14

Щам-продуцентът е култивиран на оптимизираната среда за 16 часа, при 37°C. Културалната течност е центрофугирана на 10 000 rpm за 20 min при 4°C за отстраняване на биомасата. Супернатантата е подложена на ултрафилтрация чрез системата Amicon® Stirred Cell (Millipore), под налягане (0.3 atm) с газ аргон и мембранни дискове от регенерирана целулоза с големина на порите 10 kDa (Millipore Sigma, USA). В резултат, обемът на супернатантата е редуциран 6.66 пъти; получен е концентрат с обем 15 ml и активност от 15.66 U/ml. Постигнато е 1.74 пъти пречистване и добив по активност от 50.7%, а общият протеин е редуциран 3.43 пъти. Отчитат се големи загуби на активност (~49%), вероятно поради нестабилност на ензима към условията на ултрафилтрацията.

Обем 10 ml от получения концентрат е подложен на молекулно-ситова хроматография чрез колона (94 x 2.5 cm) със Sephadex G75. Събрани са 41 фракции с обем x 7 ml (Фиг. 12).



Фигура 12. Молекулно-ситова хроматография чрез Sephadex G75 на протеолитични ензими, продуцирани от *Bacillus thuringiensis* № 14. Резултатите са средни от 3 повторения

Протеолитичните ензими се елюират в 13 фракции от 172 до 263 ml (Фиг. 12). От хроматограмата се виждат три пика на активност във фракции 19 (2.56 U/ml), 24 (1.36 U/ml) и 27 (3.77 U/ml), които се елюират съответно между 186 –

193 ml; 221 – 228 ml; 242 – 249 ml. Резултатите показват, че изследваният щам вероятно продуцира повече от една протеаза и молекулните маси на ензимите варират в широки граници. С приложената, двустепенна схема е постигнато пречистване от 5.62 пъти спрямо супернатантата. Количеството на общия протеин е редуцирано 11.56 пъти, а добивът по активност е 48.6% (Таблица 2).

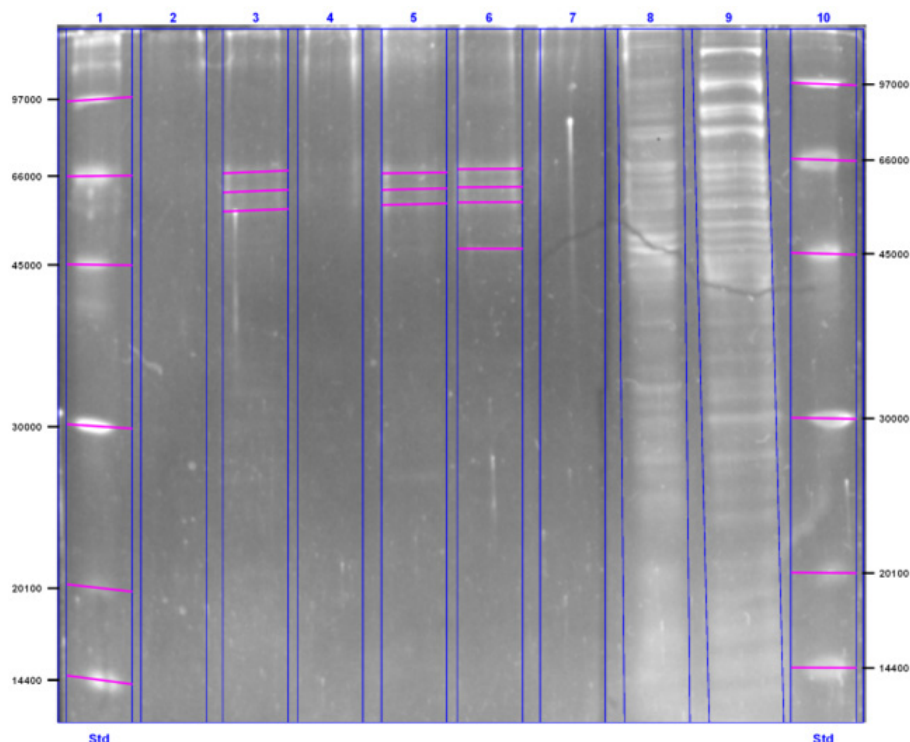
Таблица 2. Пречистване на протеолитични ензими, продуцирани от *Bacillus thuringiensis* № 14

Етап	Активност (U)	Протеин (mg)	Специфична активност (U/mg)	Пречистване (пъти)	Добив (%)
Супернатанта	308.87	97.82	3.16	–	100
Ультрафилтрат	156.60	28.50	5.49	1.74	50.70
Sephadex G75	150.15	8.46	17.74	5.62	48.61

3.4. Електрофоретични анализи

Денатурираща SDS-PAGE електрофореза

Супернатантата, ультрафилтратът и фракциите след Sephadex G75 хроматографията, в които се установява най-висока протеолитична активност (фракции № № 19, 27 и 28), са подложени на разделяне чрез SDS-PAGE електрофореза за определяне на молекулна маса (Фиг. 13).



Фигура 13. SDS-PAGE гел електрофореза на супернатанта (9), ультрафилтрат (8) и три от най-активните фракции – фракция 19 (6), фракция 27 (5) и фракция 28 (3)

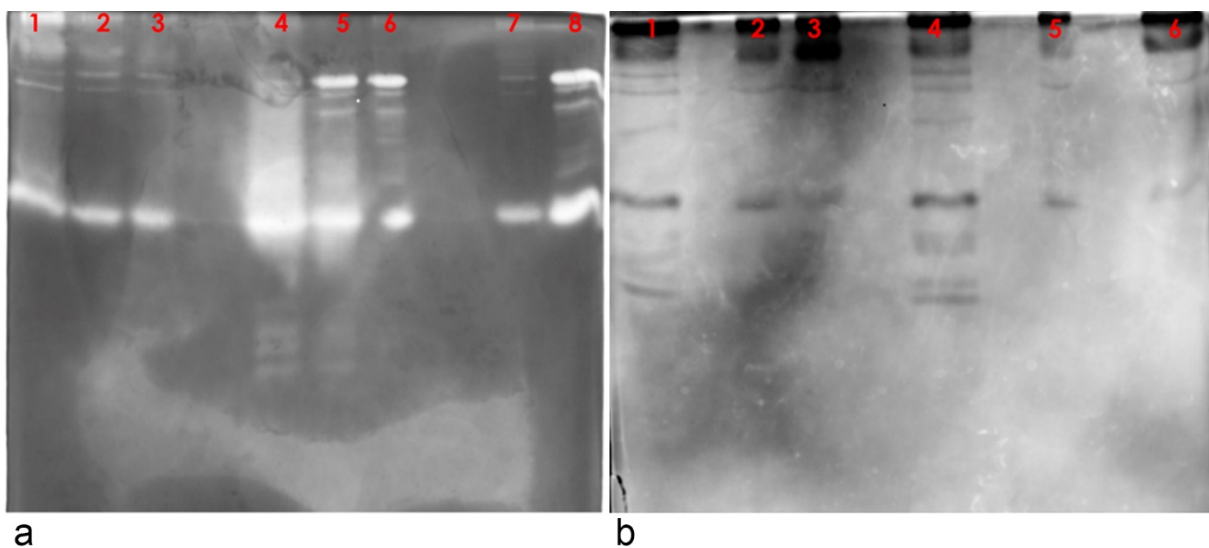
От направената електрофореза ясно се вижда, че супернатантата и ультрафилтратът имат богато съдържание на протеини с различна молекулна маса, а след ултрафилтрация тяхната концентрация се увеличава (Фиг. 13). Във фракциите, получени след гел-филтрацията се наблюдават ограничен брой

протеини – количеството е редуцирано, вследствие на извършеното разделяне по молекулна маса. Във фракции 27 и 28 се визуализират само 3 бенда, а във фракция 19 е наличен четвърти банд с по-ниска молекулна маса. С помощта на използван стандарт за определяне размера на протеините (Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit) се установява, че големината на изолираните протеини варира между 45 и 66 kDa.

Зимография на протеолитични ензими

За визуализиране на протеолитичната активност на ензимните препарати, е проведена зимография, която позволява идентификация на биологични проби с желатиназна активност чрез SDS полиакриламидни гелове, които са импрегнирани с желатин. За да се запази ензимната активност, пробите се подлагат на електрофореза при нередуциращи условия. Премахването на натриевия додецилсулфат чрез Triton X-100 и инкубацията в буфер, съдържащ калций, води до частична ренатурация на ензимите, които впоследствие могат да хидролизират желатина *in situ* (Toth et al., 2001). Наличието на желатин в целия обем, води до наситено синьо оцветяване на геловите, а бендовете се наблюдават като прозрачни, неоцветени зони, които са резултат от протеклата ензимна хидролиза на наличния желатин. Зимограмата показва, че препаратите от щам *Bacillus thuringiensis* № 14 са изключително богати на протеолитични ензими (Фиг. 14a). В супернатантата и в разредения ултрафилтрат се наблюдава добре изразена протеолитична активност и наличие на протеизи с относително ниска молекулна маса. В ултрафилтратата се вижда и втори подобен сигнал, но със значително по-висока молекулна маса.

Същият метод е приложен и за анализиране на трите най-активни фракции, елюирани от колоната със Sephadex G75 (Фиг. 14b). Във всички фракции се наблюдава изключително силен сигнал на протеолитична активност, който се дължи на протеин с висока молекулна маса. Всички фракции имат и силен сигнал на протеин с по-ниска молекулна маса, а ясно се вижда, че във фракция 19 има налично по-голямо разнообразие на протеолитични ензими.



Фигура 14. Зимография на супернатанта (a – 1, 2, 4 и 7), ултрафилтрат (a – 4, 5, 6 и 8) и трите най-активни фракции – фракция 19 (b – 1, 4), фракция 27 (b – 2, 5) и фракция 28 (b – 3, 6).

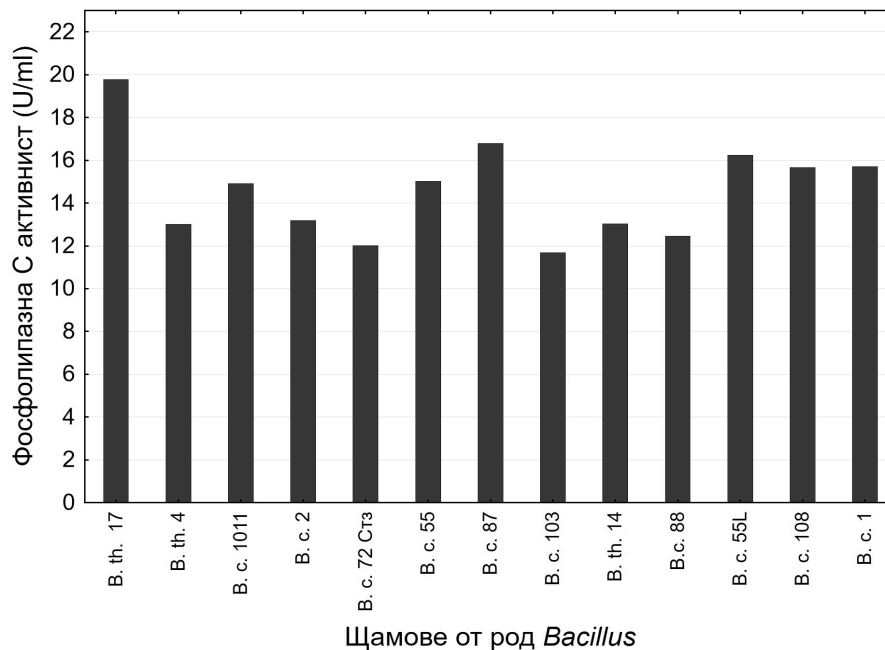
Проведените от нас изследвания показаха, че осемдесет и девет процента от анализиранияте щамове *Bacillus* са положителни за продукцията на протеолитични ензими. Селектираният в резултат на първоначалния скрининг щам *Bacillus thuringiensis* № 14 е с относително висока изходна активност – 9.2 U/ml. В резултат на проведените изследвания е оптимизиран състава на хранителната среда. Установено е, че най-добър въглероден източник е глюкозата, в концентрация 0.5%. Добавянето на магнезиевите йони, в концентрация 20 mM в културалната среда стимулира ензимната продукция. Замяната на Na₂CO₃ с фосфатен буфер осигури необходимото стабилно рН за ензимната продукция. В резултат на оптимизацията на културалните условия, протеолитичната активност в супернатантата е повишена с 53%. Продукцията на ензима в културалната среда е максимална в стационарна фаза – 16^{-я} час.

Съставена е двустепенна схема за пречистване, включваща ултра-филтрация и гел-филтрация на Sephadex G75. Колонната хроматография показва три пика на активност, което предполага продукцията на повече от един ензим с протеолитична активност и различна молекулна маса. Резултатите се потвърждават от проведената SDS-PAGE електрофореза, която доказва наличието на протеини с висока концентрация и с молекулна маса между 45 – 66 kDa. Тяхната протеолитична активност е доказана чрез нативна електрофореза и чрез зимография.

От направените SDS PAGE електрофореза и *in situ* анализ на протеолитичната активност се вижда, че във всички изследвани фракции има наличие на повече от един протеин, като същевременно присъства протеин с молекулна маса от 66 kDa. Това показва, че използваната техника на молекулено-ситова хроматография със Sephadex G75 не може да раздели достатъчно ефективно наличните протеини с близка молекулна маса. Освен това тези протеини се елюират в широк диапазон и се наблюдава изместване в профила, което се дължи на два феномена – промяна в структурата на протеините и настъпила агрегация, след концентриране на пробата и в резултат на условията на средата – температура и рН на мобилната фаза, приложено налягане и др. (Fekete et al., 2014; Carta et al., 2018).

4. Фосфолипаза С

Първоначалният скрининг за екзоензими, показва че преобладаваща част от анализиранияте щамове *Bacillus cereus* (94%) и *Bacillus thuringiensis* (86%) продуцират фосфолипаза С (ФЛС). Фосфолипазната активност на тринадесетте щамове, образували диглицеридна зона върху лецитин агар, по-голяма от 5 mm, е определена количествено по метода на Takahashi и сътр. (1981) и представена на фигура 15. От фигурата се вижда, че активността на всички изследвани щамове е висока и надхвърля 10 U/ml. Най-висока ензимна активност показаха *B. thuringiensis* щам № 17 (19.61 U/ml) и *B. cereus* щам № 87 (16.78 U/ml), (Фиг. 15).

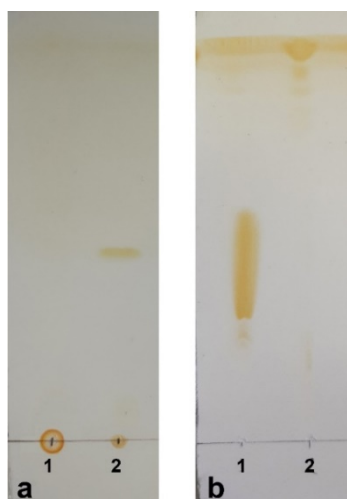


Фигура 15. Фосфолипазна С активност на щамове от род *Bacillus*. Резултатите са средни от минимум 3 повторения

В литературата, щамове на вида *B. thuringiensis* са описани главно като продуценти на фосфатидилинозитол-специфична фосфолипаза С (Titball, 1993), която е пречистена и охарактеризирана (Taguchi et al., 1980; Ikezawa & Taguchi, 1981; Griffith et al., 1991; Lereclus et al., 1996). Сравнително малко са изследванията на фосфатидилхолин-специфичната фосфолипаза С от този вид (Eddehech et al., 2019). Поради това и поради показаната най-висока изходна активност, щам *B. thuringiensis* № 17 е подбран като продуцент на фосфолипаза С и с него са проведени изследвания по оптимизация на културалните условия и пречистване на ензима.

4.1. Идентификация на реакционни продукти с тънкослойна хроматография

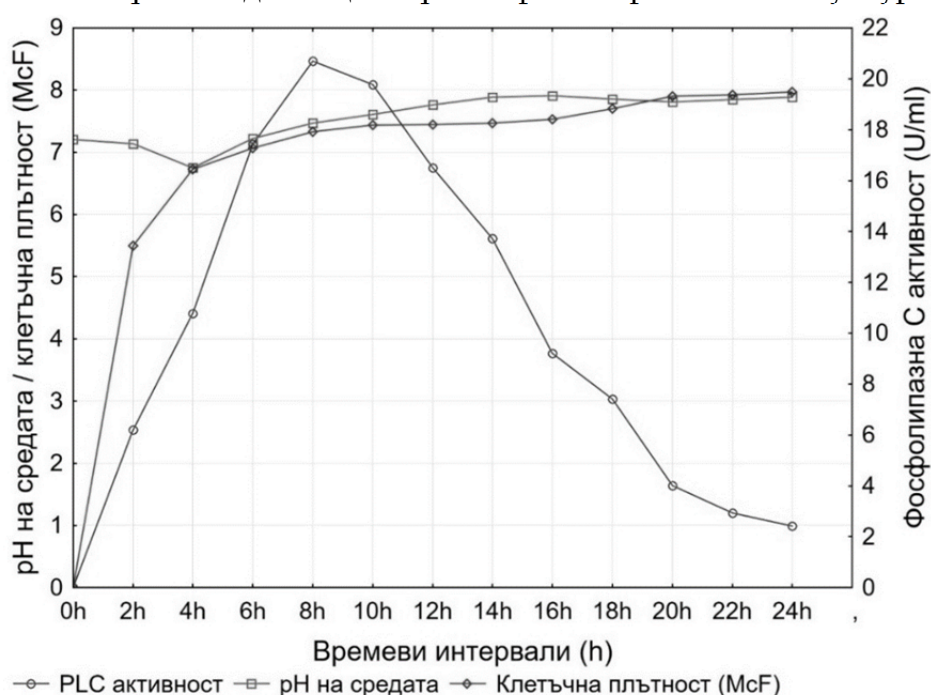
Идентификацията на реакционните продукти след ензимна хидролиза на L- α -фосфатидилхолин от фосфолипаза С, изолирана от щам *B. thuringiensis* № 17 е осъществена чрез тънкослойна хроматография (Фиг. 17). Отчетена е редукция на субстрата (L- α -фосфатидилхолин) по система хлороформ:метанол:вода (Фиг. 16b) и формиране на реакционни продукти – диглицериди по система петролеев етер:диетилов етер:оцетна киселина (фиг. 16a).



Фигура 16. Тънкослойна хроматография за идентификация на реакционни продукти след ензимна хидролиза с фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis* № 17. (a) система петролеев етер:диетилов етер:оцетна киселина (6:4:0.2). (b) система хлороформ:метанол:вода (65:25:4)

4.2. Динамика на фосфолипазната секреция

Динамиката на ензимната продукция е проследена до 24^{-я} час на среда на Герасимене и сътр. (1980) при 37°C, на ротационна клатачка (100 грм). Паралелно са отчитани промените в рН на средата и растежа на културата (Фиг. 17). Продукцията на фосфолипаза С започва на втория час, нараства рязко и достига пик на осмия час – 20.69 U/ml. Активността в културалната среда се запазва сравнително висока (19.77 U/ml) и на 10^{-я} час, след което плавно се понижава до 2.42 U/ml на 24^{-я} час от култивирането. Растежът на културата е съпроводен от промени в рН. Първоначално средата слабо се подкислява (рН 6.75 на 4^{-я} час), а в последствие се алкализира, достигайки до рН 7.9 на 24^{-я} час. Анализът на клетъчната плътност показва, че експоненциалната фаза на растеж започва след 2^{-я} час и приключва на 8^{-я} час. Максимална ензимна продукция се отчита в края на експоненциалната фаза на растеж. Фосфолипазната продукция следва клетъчния растеж до стационарната фаза на развитие на културата.



Фигура 17. Динамика на продукцията на фосфолипаза С по време на растежа на *Bacillus thuringiensis* щам № 17. Резултатите са средни от минимум 3 повторения

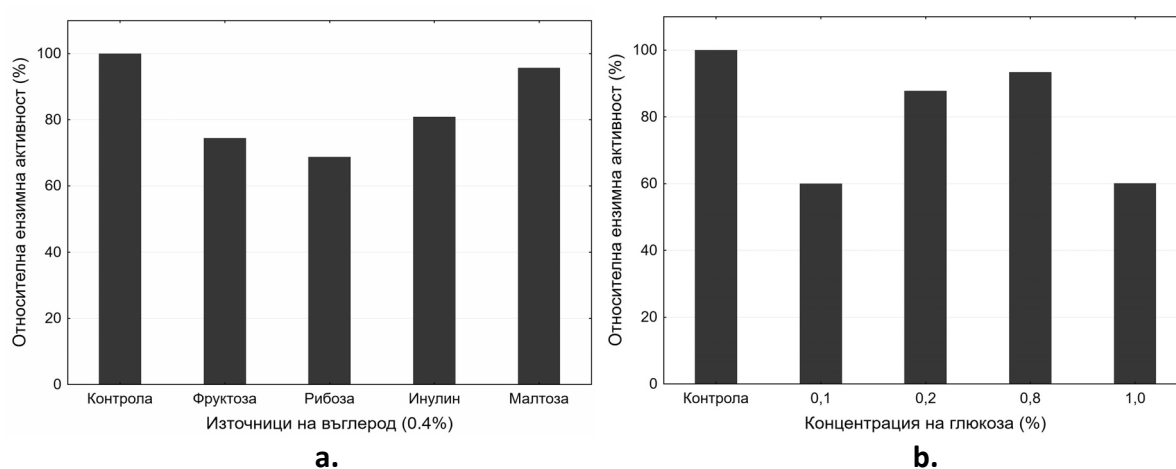
Този тип ферментация, при който се продуцира фосфолипаза С от *Bacillus*, е определена като обвързана с растежа (Shiloach et al., 1973). Blanco и сътр. (2016) описват подобни ензими при *Bacillus* като свързани с растежа (първични) метаболити, които са необходими за развитието на бактериалната култура. Освен това динамиката на продукцията на фосфолипазни ензими не е свързана с автолизирание на клетките в културата. Бактериалните фосфолипиди в интактните клетки не се хидролизират от екстрацелуларните ензими (Elleboudy et al., 2011).

4.3. Оптимизация на състава на хранителната среда за продукцията на фосфолипаза С

За определяне на ефекта на различни въглеродни източници върху продукцията на фосфолипаза С от *B. thuringiensis* № 17, глюкозата в изходната

среда на Герасимене и сътр. (1980) е заменена с други въглехидрати в идентични концентрации. Резултатите показват, че ензимната продукция е максимална, когато средата съдържа глюкоза (Фиг. 18a). Висока ензимна активност (96% от контролата), но по-ниска тази от оригиналната среда се наблюдава и при влагането на малтоза. Продукцията намалява значително, когато шамът се култивира в среда с фруктоза, рибоза или инулин, съответно 74%, 69%, 81% от контролата.

По литературни данни, по-високи концентрации на глюкоза, фруктоза или малтоза водят до редуциране и дори инхибиране на синтеза на фосфолипазни ензими (Zhao et al., 2018). Получените от нас резултати показват, че постепенното увеличаване на концентрацията на глюкоза води и до увеличаване на продукцията на фосфолипаза С. Най-висока активност се наблюдава в среда с 0.4% глюкоза, а при по-високи концентрации продукцията намалява (Фиг. 18b).

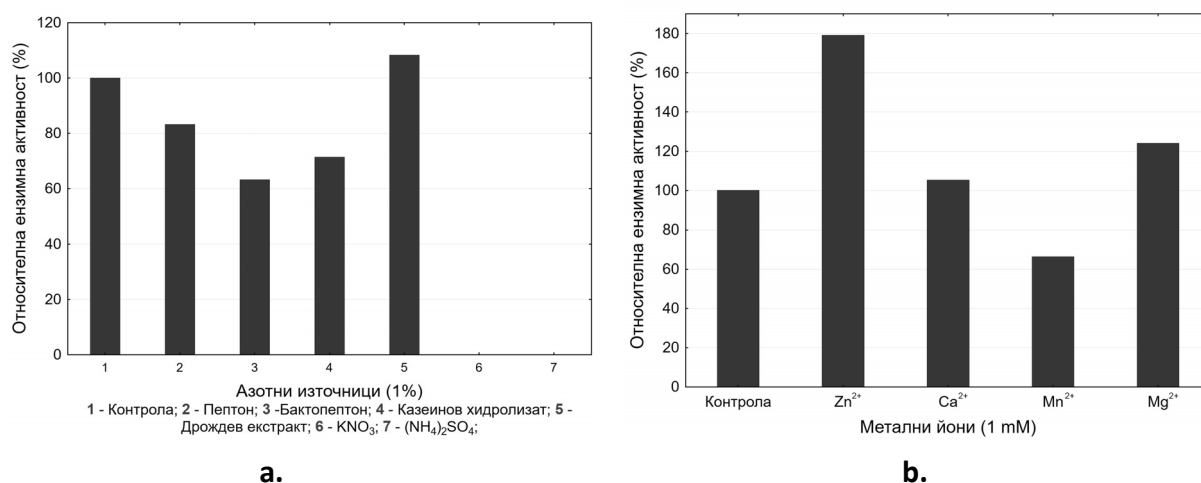


Фигура 18. Ефект на въглеродни източници (а) и на концентрацията на глюкоза (б) върху продукцията на фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis* № 17. Контрола – среда с глюкоза в концентрация 0.4%. Резултатите са средни от минимум 3 повторения

Източникът на азот е важен фактор за растежа и фосфолипазната продукция на микроорганизмите. С цел оптимизация състава на средата е изследвано влиянието на 6 азотни източника върху продукцията на фосфолипаза С от *B. thuringiensis* № 17 – пептон, бактопептон, казеинов хидролизат, дрождев екстракт, калиев нитрат и амониев сулфат (Фиг. 19a). Резултатите показват, че фосфолипазната продукция е слабо завишена, когато като азотен източник се използва дрождев екстракт. Шамът *B. thuringiensis* № 17 не може да усвоява неорганични източници на азот. По-голяма част от литературните данни посочват, че шамовете *B. thuringiensis* не могат да използват неорганични съединения като основен източник на азот (Thayumanavan et al., 2005; El-Bendary et al., 2006). За да се гарантира растеж на културата, средата трябва да съдържа източник на поне една от следните аминокиселини – глутамат, аспартат, валин, левцин, серин или треонин, но добавянето на цистин или цистеин води до пълно инхибиране на растежа и формирането на токсини (El-Bendary et al., 2006, Sadek et al., 2000). Най-добри източници на азот са органични вещества с непостоянен състав – пептон, казеинов екстракт, дрождев екстракт и други (ICGEN et al., 2002). Когато хранителната среда е богата на

протеини и хидролизати, допълнително добавените свободни аминокиселини се използват по-скоро като източник на въглерод (El-Bendary et al., 2006).

В настоящата работа е изследван ефектът на метални йони (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+}) в концентрация 1 mM върху продукцията на фосфолипаза С. Резултатите показват, че цинковите, магнезиевите и калциевите йони стимулират ензимната продукция, съответно със 179%, 124% и 105% (Фиг. 19b). От друга страна, Mn^{2+} инхибира продукцията на ФЛС. Фосфолипазите, продуцирани от род *Bacillus* съдържат два цинкови атома в своята протеинова структура (Little & Othnaess, 1975), което обяснява ролята на металния йон за биосинтеза на ензима. Премахването на един от цинковите атоми с хелатиращи агенти води до редуциране на ензимната активност, а отстраняването на втория цинков атом води до пълна загуба на активността. Този ефект е обратим, ако се добавят цинкови йони в ензимния разтвор (Little & Othnaess, 1975). Цинковите йони могат директно да участват в катализираната реакция или да допринасят за поддържане на стабилна протеинова структура. Цинковите йони функционират при всички каталитични сайтове като Люисова киселина – химични съединения, които съдържат свободна орбитала, която е способна да приема електронни двойки (Keith et al., 2000). Установеният от нас стимулиращ ефект на Ca^{2+} може да бъде обяснен с ролята му в активирането на цитоплазмени и мембранни ензими и в осъществяването на редица метаболитни процеси в клетката (Roufogalis, 1985).

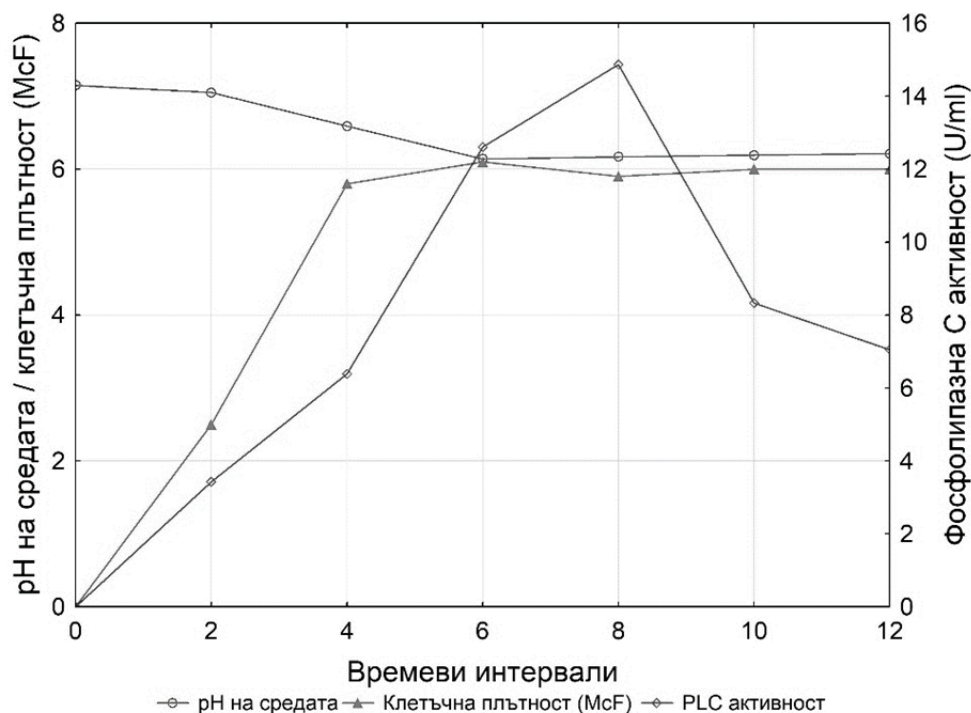


Фигура 19. Ефект на азотни източници (а) и на метални йони (б) върху продукцията на фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis* № 17. Контрола – фосфолипазната активност на среда без йони

4.4. Продукцията на фосфолипаза С при култивиране в биореактор

Динамиката на ензимната продукция е изследвана при мащабиране на процеса чрез култивиране в биореактор с обем 2 L (Фиг. 20). В биореактора, културата се развива по-бързо и достига стационарна фаза на 6^{-я} час. Профилът на ензимната секреция по време на растежа е сходен с този при култивиране в лабораторни условия (в колби). Фосфолипаза С започва да се продуцира на 2^{-я} час и достига пик на 8^{-я} час, с активност от 14.87 U/ml. Веднага след това, на 10-я час активността пада почти наполовина. През цялия инкубационен период културалната среда плавно се подкислява, достигайки рН от 6.21 на 12^{-я} час от култивирането. Пикът на ензимната активност в средата се отчита при рН 6.17.

Независимо, че фосфолипаза С се продуцира в идентичен времеви интервал, при култивирането в биореактор, рН на средата, ензимната активност и клетъчната плътност се различават. За разлика от култивирането в колби, в биореактора средата трайно се подкислява и запазва стойност от около рН 6. Освен това, при култивирането в колби клетъчната плътност е много по-висока. На 8-я час, когато се отчита максимална ензимна активност в супернатантата, клетъчната плътност е 7.4 McF, докато при култивирането в биореактор, клетъчната плътност е 5.9 McF. Отчита се и разлика в активността, която в биореактора е с около 28% по-ниска.



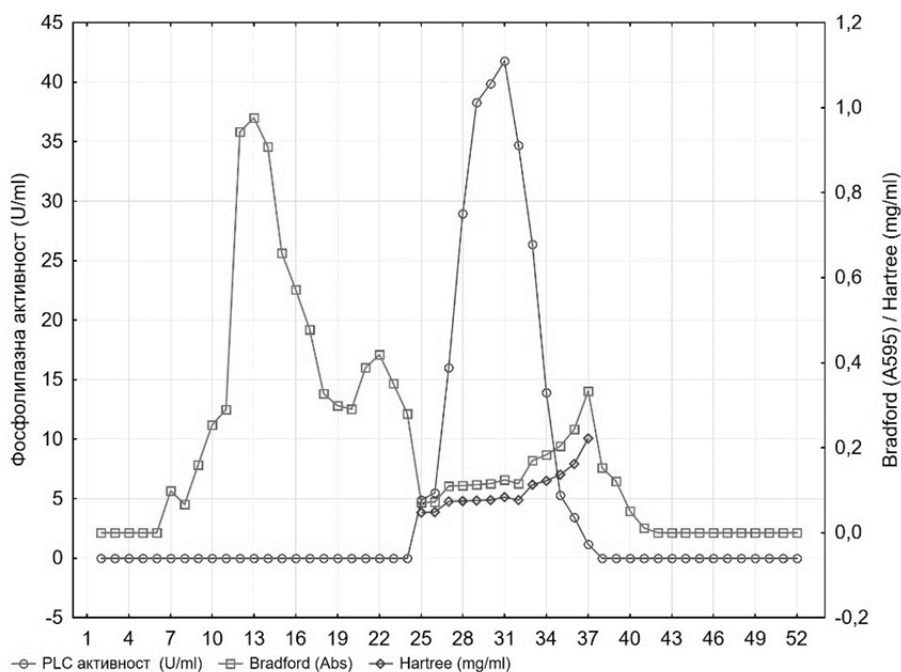
Фигура 20. Динамика на фосфолипазната продукция при щам *Bacillus thuringiensis* № 17 в биореактор

В резултат на проведените изследвания са установени оптималните културални условия за продукция на фосфолипаза С от селектирания в резултат на първоначалния скрининг щам *B. thuringiensis* № 17. Фосфолипазната секреция е максимална при култивиране на среда, съдържаща глюкоза в концентрация от 0.4%, дрождев екстракт като азотен източник и цинкови йони в концентрация от 1 mM. Максимална ензимна продукция се наблюдава при култивиране на щама в продължение на 8 часа, при 37°C. Екстрацелуларната фосфолипазна секреция на оптимизираната среда, инокулирана със 7.5% инокулум достигна 31 U/ml, което е със 67% над изходната активност. Високата ензимна активност и ранният етап на секреция на екстрацелуларния ензим (6 – 8 час, експоненциална фаза) предоставят перспективи за биотехнологично приложение на фосфолипаза С от щам *B. thuringiensis* № 17.

4.5. Пречистване на фосфолипаза С

Културалната супернатантата е концентрирана чрез ултрафилтрация със системата Amicon® Stirred Cell, под налягане с аргон, през нитроцелулозна мембрана с големина на порите от 10 kDa. Ултрафилтратът е подложен на

молекулно-ситова хроматография чрез колона (94 x 2.5 cm) със Sephadex G75. Събирани са фракции с обем по 7 ml със скорост 15 ml/h. Фосфолипаза С се елюира в 13 фракции от 219^{-ти} до 310^{-ти} ml (Фиг. 21) в зона с ниско белтъчно съдържание. Голяма част от протеините в ултрафилтратата, очевидно с по-голяма молекулна маса се елюират преди ФЛС, поради което ензимът се освобождава от голяма част от съпътстващите белтъци.



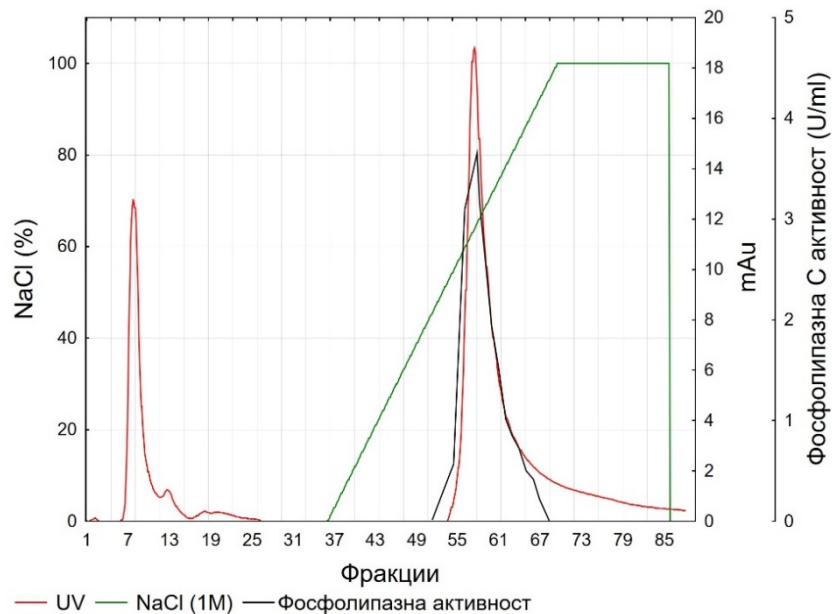
Фигура 21. Молекулно-ситова хроматография на фосфолипаза С от *Vacillus thuringiensis* № 17. Резултатите са средни от 3 повторения

С комбинацията от ултрафилтрация и гел-филтрацията е постигнато пречистване от 30.77 пъти спрямо супернатантата. Количеството на общия протеин е редуцирано 60.65 пъти, а добивът по активност е 50.73 (Таблица 3).

4.5.4. FPLC (бърза протеинова течна хроматография)

Препарат, получен след молекулно-ситова хроматография е нанесен на колона HiPrep DEAE FF 16/10. В резултат на хроматографското разделяне се наблюдават два белтъчни пика. Една част от протеините, които не се абсорбират за носителя се елюират с промивания буфер (Фиг. 22). Вторият протеинов пик съвпада с фосфолипазната активност, която се елюира в средно 13 фракции между 140 ± 6 ml до 180 ± 6 ml при концентрация на NaCl от 325 mM.

С йонообменна хроматография е постигнато пречистване от 54.45 пъти с добив от 35.18%. Протеините са редуцирани 155 пъти в сравнение с количество им в супернатантата (Таблица 3).



Фигура 22. HiPrep DEAE хроматография на фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis* № 17. Общият белтък е определен като абсорбция при 280 nm. Резултатите са средни от 5 повторения

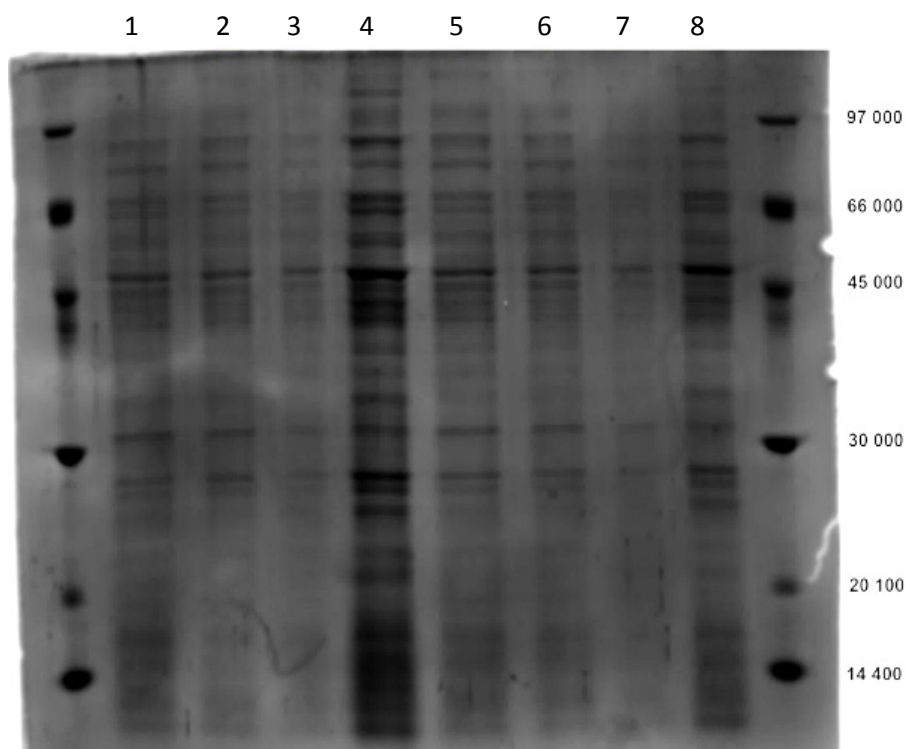
Таблица 3. Пречистване на фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis* № 17 (n= 4)

Етап	Активност (U)	Протеин (mg)	Специфична активност (U/mg)	Пречистване (пъти)	Добив (%)
Супернатанта	3537.07	1008.64	3.51	–	100.00
Ультрафилтрат	3091.40	171.75	18.00	5.13	87.40
Sephadex G75	1794.454	16.63	107.89	30.77	50.73
HiPrep DEAE	1244.228	6.52	190.93	54.45	35.18

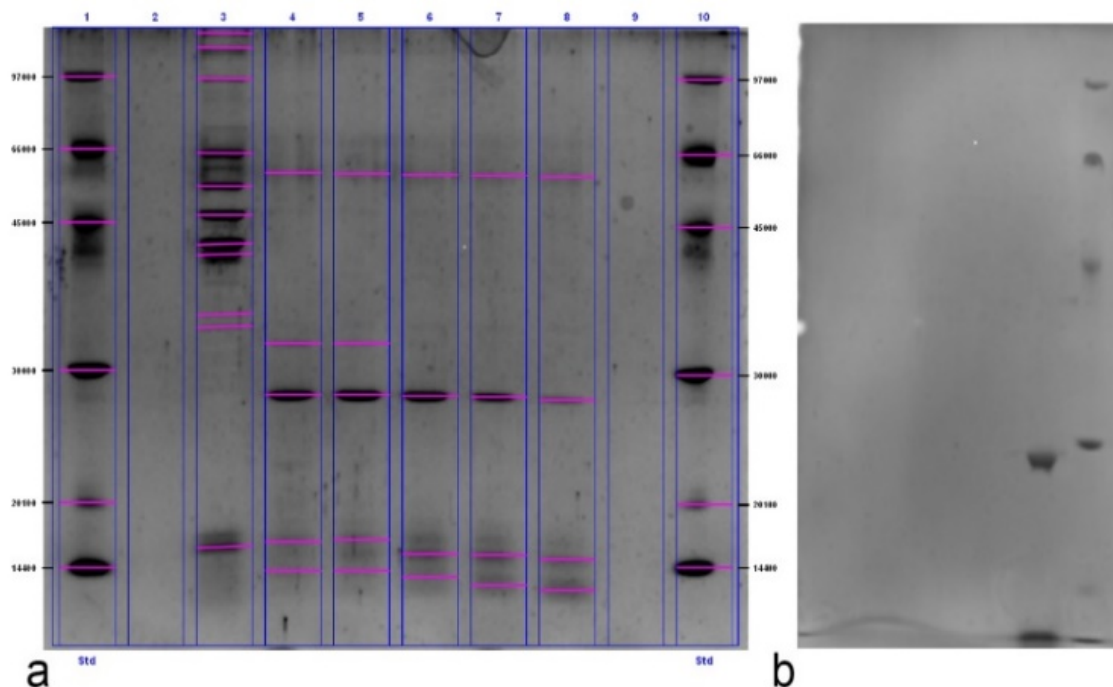
5.6. Електрофоретични анализи

Културалната супернатанта на *Bacillus thuringiensis* 17, ультрафилтратът (Фиг. 23), препарат след молекулно-ситова хроматография и след FPLC (Фиг. 24) са подложени на денатурираща SDS-PAGE електрофореза за определяне на белтъчния профил и чистотата на ензимните препарати. От фигура 24 се вижда, че в супернатантата и ультрафилтратът са налични голямо разнообразие от протеини с варираща молекулна маса от 10 до над 100 kDa. Това наблюдение потвърждава резултатите на Nan и сътр. (2017), че представителите от род *Bacillus* експресират и секретират над 40 различни екстрацелуларни ензима.

След проведена молекулно-ситова хроматография голяма част от наличните протеини са редуцирани, като в най-активните фракции се вижда наличие на протеин във висока концентрация с молекулна маса между 25 – 30 kDa. В по-малки количества са налични и поне още два протеина с молекулна маса около 66 kDa и още два протеина с молекулна маса около 14 000 kDa (Фиг. 24). След йонообменна хроматография на HiPrep DEAE е наличен един протеин молекулна маса между 25 – 30 kDa (Фиг. 24), което доказва, че фосфолипаза С е пречистена до хомогенно състояние.



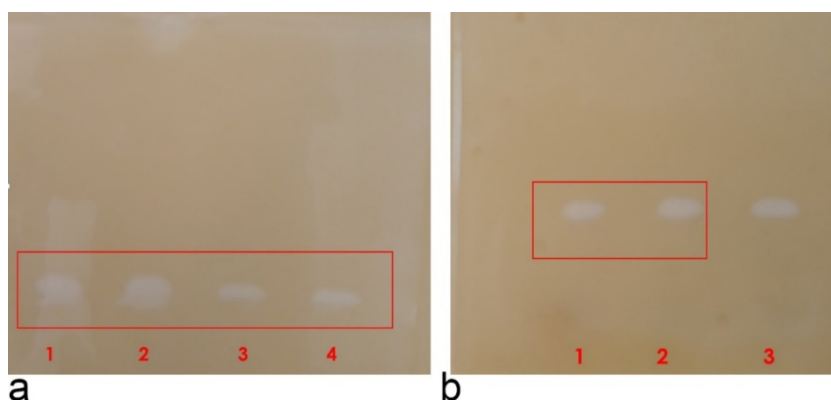
Фигура 23. SDS-PAGE гел електрофореза на ензимни препарати от *Bacillus thuringiensis* № 17. (1) неразредена супернатанта, (2) два пъти разредена супернатанта, (3, 7) четири пъти разредена супернатанта, (4) неразреден ултрафилтрат, (5, 8) два пъти разреден ултрафилтрат, (6) четири пъти разреден ултрафилтрат



Фигура 24. SDS-PAGE гел електрофореза на SDS-PAGE гел електрофореза на пречистени ензимни препарати от *Bacillus thuringiensis* № 17. (a) след гел филтрация със Sephadex G75, (a: 4, 5, 6, 7) фракции с най-висока фосфолипазна С активност (a: 3) фракция с високо протеиново съдържание, но без фосфолипазна С активност; (b) ензимен препарат след пречистване с йонообменна хроматография (FPLC)

Зимография на фосфолипаза С

За да се потвърди фосфолипазната активност в изследваните преапрати, е извършен зимографски анализ с проби, които не са предварително денатурирани и са разделени чрез SDS-PAGE гелове без редуциращи агенти. След електрофореза ензимите са ренатурирани, а гелове са поставени върху агарозен гел, съдържащ яйчен жълтък и инкубирани до визуализиране на бели бендове, доказващи хидролизата. Резултатите ясно показват, че в супернатантата има ензим с лецитиназна активност. Бендът при ултрафилтратата е с по-голяма площ поради концентрацията на фосфолипазата (Фиг. 25а). В препарата след молекулно-ситова хроматография отново се вижда същия бенд, което показва, че ензимът е пречистен и с добър добив (Фиг. 25б).



Фигура 25. Зимография на фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis* № 17 с различна степен на пречистване (а: 1, 2 – супернатантата; (а: 3, 4) – ултрафилтрат; (б: 1, 2, 3) – пречистена фосфолипаза С след молекулно-ситова хроматография

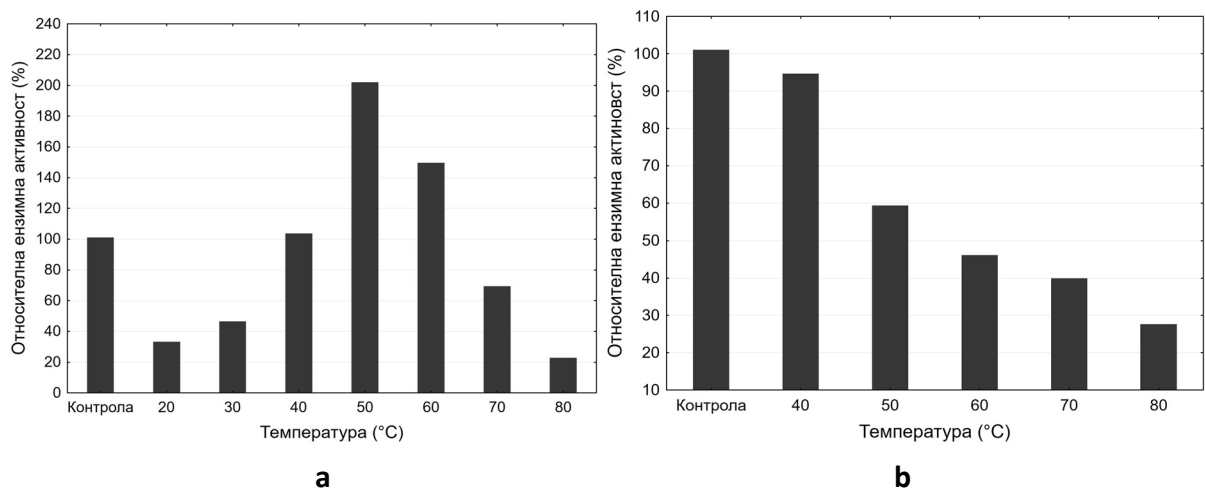
4.7. Свойства на фосфолипаза С

4.7.1. Температурен оптимум и температурна стабилност

За определяне на температурния оптимум на действие на фосфолипаза С, ензимната реакция е проведена при различни температури – от 20°C до 80°C (Фиг. 26а). Оптималната активност на фосфолипаза С (202% спрямо контролата) е установена при 50°C. При температура на реакцията 60°C, активността също е по-висока от контролата. При ниски температури – 20 и 30°C, съответно, ензимът проявява слаба активност – 33% и 46%. Активността спада и при увеличаване на температурата на реакцията над 60°C.

За да се установи температурната стабилност на ензима, аликвотни части от него са инкубирани в продължение на 30 минути при температури от 40°C до 80°C, след което е проведена ензимна реакция. Установено е, че ензимът губи 40% от активността след третиране при 50°C. След третиране при 80°C той запазва около 30% от своята активност (Фиг. 26б).

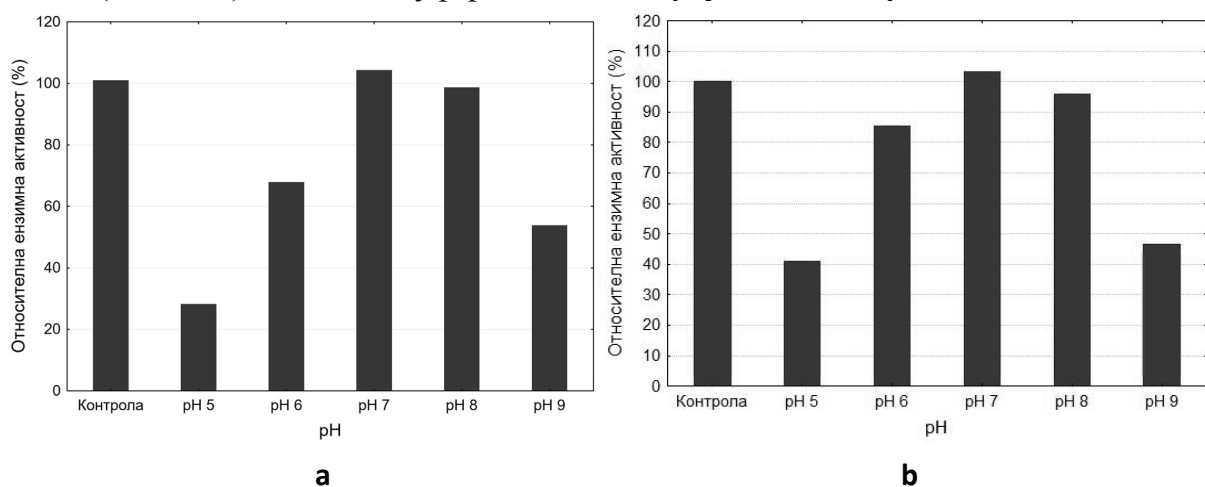
Бактериалните фосфолипази С имат вариращ температурен оптимум. Elleboudy и сътр. (2016) съобщават, че изолираният от тях ензим от *Bacillus thuringiensis* проявява най-висока активност, когато реакцията се провежда при 37°C, 40°C и 45°C. Ензимът е нестабилен при по-високи температури. Активността му спада до 20% след инкубиране за 30 минути при 60°C и почти напълно се инхибира при третиране за 30 min при 70°C.



Фигура 26. Температурен оптимум (а) и температурна стабилност (б) на фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis* № 17. Контрола – реакция, проведена съответно при 37°C и с нетретиран ензим

4.7.2. рН оптимум и рН стабилност

Определяне на рН диапазона на ензимната активност има основна роля в провеждането на множество реакции. Фосфолипаза С на *B. thuringiensis* проявява максимална активност при провеждане на ензимната реакция в рН интервала 7.0 – 8.0. При рН 9.0 ензимната активност се редуцира с 56%, а при рН 6.0 – редукцията е с 32% (Фиг. 27а). Видът на буфера не влияе върху ензимната реакция.



Фигура 27. рН оптимум (а) и рН толерантност (б) на фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis* № 17. (Реакциите при рН 5.0 и рН 6.0, съответно са проведени в 0.2 М $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$, а реакциите при рН 7.0, 8.0, 9.0, съответно в 0.2 М $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7-\text{HCl}$). Контрола – реакция при рН 7.2 и реакция, проведена с нетретиран ензим, съответно

Получените от нас резултати са сходни с докладваните от Elleboudy и сътр. (2016), които установяват рН оптимум на пречистената от тях фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis* при рН 7.2. Ензимът запазва 75% от активността си при рН 8.0 и 25% – при рН 9.0. Ikezawa и Taguchi (1981) също съобщават за стойности на рН 7.2 – 7.5, в които фосфолипазния С ензим е най-високо активен.

За определяне на рН устойчивостта на фосфолипаза С, аликвотни части от ензимния препарат са инкубирани за 30 min в буфери с рН от 5.0 до 9.0.

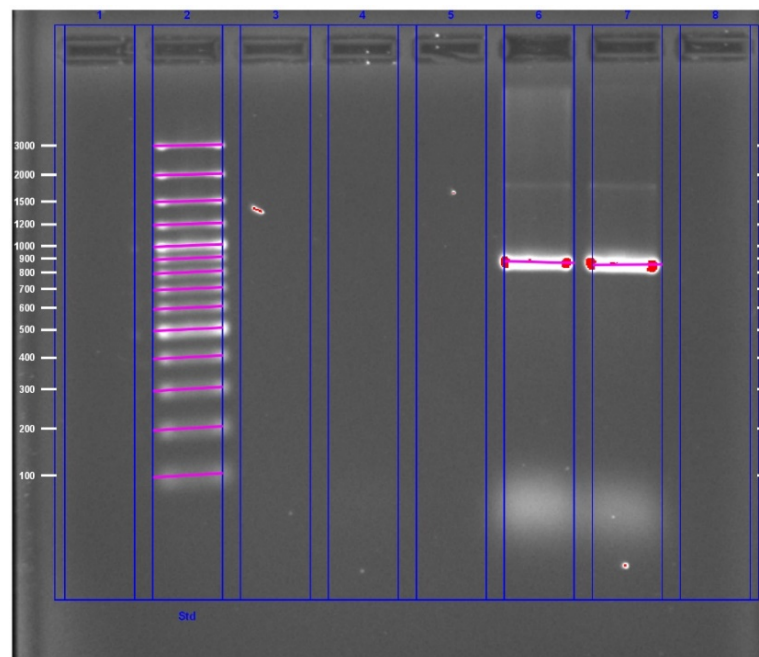
Установи се, че фосфолипаза С запазва своята активност в буфер с рН 7.0 и 8.0 (104 и 99% съответно от активността на контролата), но активността рязко намалява (с 53%) при рН 9.0, докато третирането на ензима при рН 6.0 води до редукция на активността с 15% (Фиг. 27b).

рН оптимумът и рН стабилността са свойства на ензимите, които варират при различните щамове и видове продуценти. Преобладаваща част от фосфолипазите С проявяват максимална активност в неутралната област на рН.

4.8. Молекулярно биологични изследвания

За да се изолира гена, кодиращ фосфатидилхолин специфична фосфолипаза С от *B. thuringiensis* първоначално са изследвани секвенциите на хомоложни ензими в различни организми. Секвенциите на тези гени бяха взети от базата данни NCBI, а анализът е осъществен с помощта на софтуер *Geneious* (Biomatters, Нова Зеландия). Консенсусните секвенции бяха използвани, за да се създадат подходящи праймери, които впоследствие бяха анализирани чрез алайнмънт с генома на *B. thuringiensis*.

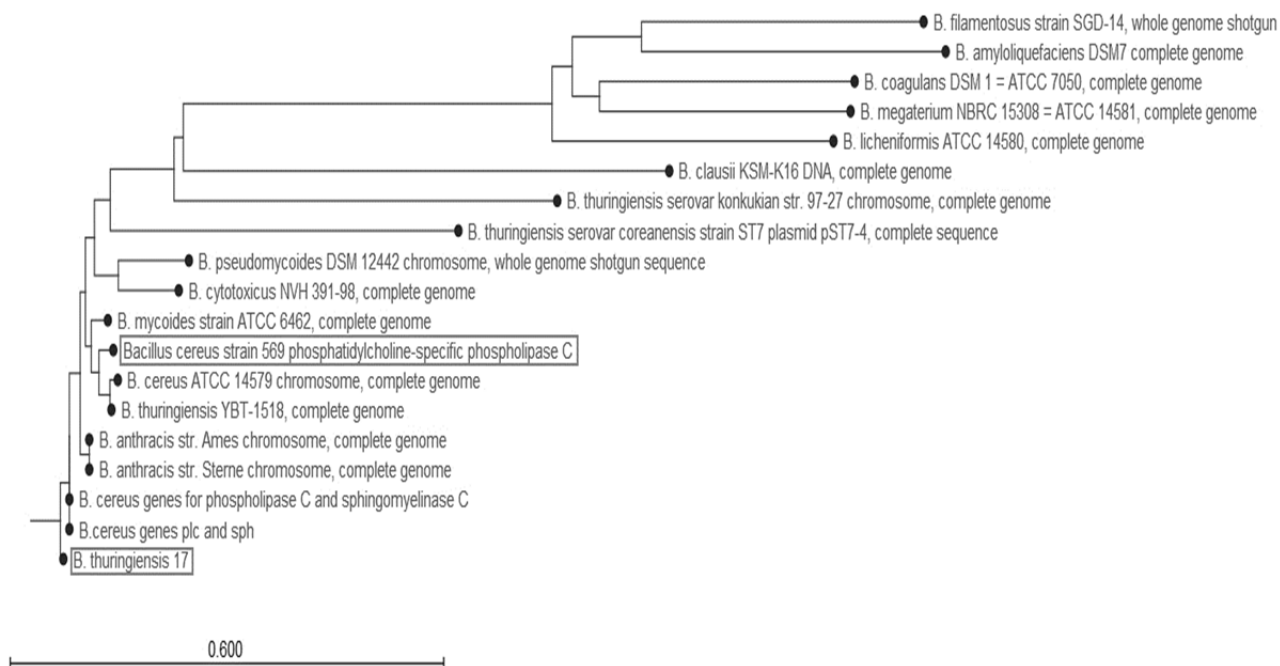
След проведени амплифициране и агарозна електрофореза е установено, че е изолиран фрагмент от генома на изследвания шам с дължина от 800 – 900 базични двойки (Фиг. 28). Размерът на фрагмента корелира с резултатите от извършения първоначален биоинформатичен анализ. Изолираният фрагмент геномна ДНК от *B. thuringiensis* № 17 е пречистен от агарозата и секвениран чрез секвенатор ABI 3730 XL от Macrogen, Холандия по метода на Sanger с терминиране на веригата. Получената секвенция беше предварително анализирана чрез онлайн инструмента *ORFfinder* на Националния център за биотехнологична информация (NCBI, САЩ), при което бе установено, че е налична една отворена рамка за четене с дължина от 836 нуклеотидни двойки, формиращи 278 кодона. Големината на секвенцията корелира с очакваната спрямо резултатите от проведения електрофоретичен анализ (Фиг. 28).



Фигура 28. Агарозна електрофореза на продукти след PCR амплифициране на гена, кодиращ фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis* № 17

Генът кодира протеин с дължина от 278 аминокиселини. Анализ на съществуващите библиотеки генетична информация в NCBI чрез локален алайнмънт с помощта на инструмента BLAST показва, че получената секвенция е 99% идентична със секвенции в геномите на *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* и други, които секвенции обаче са с неустановена функция и не са идентифицирани.

Създадена е библиотека от 19 гена, кодиращи фосфолипаза С при различни видове и щамове от род *Bacillus* в която е добавен и генът, кодиращ ензима в *Bacillus thuringiensis* № 17. Единственото условие за избор на гените, е те да са кодиращи фосфолипаза С в геномите на представители от род *Bacillus*. Целта на този експеримент е да се определи близостта на на гените, кодиращи фосфолипаза С при различни видове и щамове от род *Bacillus* (Фиг. 29). За конструирането е използван *neighbor-joining* метод, а определянето на генетичните разстояния между отделните разклонения е осъществено по метода на *Jukes-Cantor*. Тъй като сравнението е спрямо гена на *B. thuringiensis* № 17, той бе избран да бъде в основата на изграденото дърво, при което се видя, че се образуват две отделни кледи. В първата кледи се намира изолираният от нас ген, а във втората основна се намират всички останали. Изолираният ген е най-близък до гените за фосфолипаза С и сфингомиелиназа от *Bacillus cereus*. След тях високо сходство се наблюдава с гени от *Bacillus anthracis* – *B. anthracis* str. Ames и *B. anthracis* str. Sterne. Макар на пръв поглед генът на *B. thuringiensis* № 17 да е почти идентичен с гена, кодиращ фосфатидилхолин специфична фосфолипаза С от щам на *B. cereus* (97% идентичност в секвенциите), генетичното разстояние между двата е по-голямо, отколкото при други. Най-отдалечен е генът на *B. amyloliquefaciens* DSM7 (Фиг 29).



Фигура 29. Дендограма на гените, които кодират фосфолипази С от различни видове и щамове от род *Bacillus*

ИЗВОДИ

От проведените изследвания и получените резултати могат да се направят следните по-важни изводи:

1. От изследваните 166 щамове от род *Bacillus*, 31% проявяват амилолитична активност, 89% протеолитична и 87% фосфолипазна С активност. Установена е положителна корелация между протеолитичната и фосфолипазната активности.
2. На базата на първоначалния скрининг са селектирани щамове: *Bacillus cereus* № 10, *Bacillus thuringiensis* № 14 и *Bacillus thuringiensis* № 17, като продуценти на извънклетъчни амилази, протеази и фосфолипаза С, съответно. Оптимизирани, по отношение на въглеродни източници, източници на азот, двувалентни йони са средите за продукцията на ензимите и е определена динамиката на ензимната продукция.
3. На оптимизираната среда амилолитичната активност на щам *Bacillus cereus* № 10 достига 4.3 U/ml. Ензимът се секретира в културалната среда през продължителен период от време и достига максимум на 36^я час.
4. При щам *Bacillus thuringiensis* № 14 е отчетена е протеолитична активност от 15.76 ± 2.33 U/ml след 16 часа култивиране. Замяната на буферизиращата система в състава на средата доведе до над два пъти увеличение на протеолитичната активност в супернатантата.
5. *Bacillus thuringiensis* щам № 14 продуцира повече от един протеолитичен ензим. С гел-филтрация на Sephadex G75, са изолирани 3 фракции с протеолитична активност, а молекулната маса на ензимите, чиято активност е доказана чрез зимография е между 45 – 66 kDa.
6. *Bacillus thuringiensis* щам № 17 продуцира максимално количество фосфолипаза С в края на експоненциалната фаза на растеж – 8^я час, при температура 37°C, на оптимизирана среда, инокулирана със 7.5% инокулум.
7. Съставена е тристепенна схема, включваща ултрафилтрация, гел-филтрация и йонообменна-хроматография, с която фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis* щам № 17 е пречистена до хомогенно състояние.
8. Пречистената фосфолипаза С проявява активност при по-високи температури (50°C), но губи стабилност при продължително третиране в подобни условия. Хидролизната реакция протича оптимално при рН 7.0. Активността на ензима се стимулира от присъствието на цинкови, железни, магнезиеви и калциеви йони, в посочения ред.
9. Ензимът на *Bacillus thuringiensis* щам № 17 е фосфатидилхолин-специфична фосфолипаза С и хидролизира фосфолипидите със следния ред – фосфотидилхолин, фосфатидилетаноламин и фосфатидилсерин. Ензимът е с молекулна маса между 25 и 30 kDa.
10. Чрез конструирани специфични праймери и полимеразна верижна реакция е изолиран ДНК продукт от геномна ДНК от *Bacillus thuringiensis* № 17 с големина между 800 – 900 bp, отговарящ по големина на гена за фосфолипаза С.
11. Резултатите от секвенирането на изолирания фрагмент показват висока идентичност с гени, кодиращи фосфатидилхолин-специфична фосфолипаза С в *Bacillus cereus*, както и с гени за фосфолипази С на *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus anthracis*.

ПРИНОСИ

Приноси с оригинален характер

1. Доказана е положителна корелация между продукцията на фосфолипаза С и протеази при щамове *Bacillus cereus* и *Bacillus thuringiensis*.
2. Установено е, че замяната на карбонатната буферираща система с фосфатен буфер поддържа необходимото рН за продукцията на протеолитични ензими от *Bacillus thuringiensis* щам № 14, като същевременно не инхибира ензимната активност.
3. В резултат на оптимизацията на културалните условия е постигната висока активност на фосфолипаза С (31 U/ml) в културалната среда на щам *Bacillus thuringiensis*.
4. Разработена е схема за пречистване на фосфолипаза С от щам *Bacillus thuringiensis* до хомогенно състояние.
5. Установен е температурен оптимум на фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis* в интервала 50 – 60°C.
6. Изолиран е и е секвениран генът, който кодира фосфолипаза С при *Bacillus thuringiensis* № 17. Доказана е най-висока степен на хомология с гена, от *Bacillus cereus*, кодиращ фосфатидилхолин-специфична фосфолипаза С.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдено е, че щамовете *Bacillus cereus* и *Bacillus thuringiensis* са много добри продуценти на екстрацелуларни ензими, включително фосфолипаза С и протеази.
2. Потвърдена е секрецията на повече от един протеолитичен ензим по време на растежа на *Bacillus thuringiensis*.
3. Потвърдена е максимална продукцията на фосфолипаза С в културалната среда в експоненциалната фаза на растеж на *Bacillus thuringiensis*.
4. Потвърден е стимулиращия ефект на цинкови и калциеви йони върху активността на пречистената фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis*.
5. Потвърдена е субстратната специфичност на фосфатидилхолин-специфичната фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis*.
6. Потвърдена е молекулната маса на фосфатидилхолин-специфичната фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis*.

Публикации във връзка с дисертацията

- Stefanov Y., Iliiev I., Marhova M., Kostadinova S. 2018. Isolation and Purification of Proteolytic Enzymes, Produced by Strains of Genus *Bacillus*. ECOLOGIA BALKANICA, 10(2), 185 – 197.
- Stefanov Y., Iliiev I., Marhova M., Kostadinova S. 2018. Optimization of nutritive medium composition for production of amylase by *Bacillus* strains. J. BioSci. Biotech, 7(2-3): 103 – 107.

Участия в научни форуми

1. Stefanov Y, Marhova M, Iliiev I, Kostadinova S. 2016. Amylase activities of *Bacillus* strains. Първа национална докторантска конференция по биология, 1 Ноември 2016, Пловдив, България – постер.
2. Stefanov Y., Iliiev I., Marhova M., Stefanova B., Kostadinova S. 2018. Isolation and purification of proteolytic enzymes, produced from strains of genus *Bacillus*. Book of Abstracts, p. 50. Трета научна конференция по екология, Пловдив, 2 – 3 ноември 2018 г. – постер.
3. Stefanov Y., Iliiev I., Marhova M., Kostadinova S. 2017. Phospholipase C Production by *Bacillus* Isolates and Optimization of Growth Conditions. Book of Abstracts. IV Balcan Scientific Conference on Biology (BalkanBio) – 1 – 3.11.2017 г. – постер.

Summury

In recent years it has been shown that enzyme-catalyzed reactions can be an alternative to some massively used chemical processes. For the development of new enzyme products and improving of existing ones, microorganisms are often used. Species of genus *Bacillus* are of particular interest because they can produce a large variety of extracellular enzymes. Microorganisms are preferred to plant and animal sources of enzymes, because the product is cheaper, more thoroughly controlled and enzymes are easy for purification (Burhan et al., 2003).

In the present study, we have investigated the extracellular enzyme production of 166 *Bacillus* strains. We have found that strains *B. cereus* № 10, *B. thuringiensis* № 14, and *B. thuringiensis* № 17 are a strong producers of amylase, protease, and phospholipase enzymes respectively. The strain *B. cereus* № 10 was found to produce the maximum amount of amylase enzymes when cultured on a modified medium containing 1% starch as the main source of carbon and 0.1% of ribose as a secondary source of carbon, 0.2% yeast extract, 1 mM CaCl₂ for 36 hours at 37°C.

The maximum amount of protease enzymes are produced by *B. thuringiensis* strain № 14 when it is cultivated in a modified liquid medium buffered with 50 mM phosphate buffer and containing 0.5% glucose, 1 mM MgSO₄, inoculated with 5% inoculum, for 16 hours at 37°C. The proteases were partially purified by size-exclusion chromatography with Sephadex G75. After a performed SDS PAGE gel electrophoresis it was discovered that the strain is producing more than one protease with a molecular weight between 45 and 66 kDa. Their proteolytic activity was established with in situ analysis.

The selected strain *B. thuringiensis* № 17 has shown an initial phospholipase C activity of 19.61 U/ml. High enzyme yields were reached when the strain was cultivated for 8 hours at 37°C in a modified medium of Gerasimene et al. (1980) containing 0.4% glucose, 1% yeast extract, 1mM ZnCl₂. Identical results were achieved when the production was scaled up in a 2-liter benchtop bioreactor. The enzyme was purified to homogeneity using a 3 step scheme, including ultrafiltration, size-exclusion chromatography with Sephadex G75 and ion-exchange chromatography using a FPLC system with HiPrep DEAE FF 16/10 column. The isolated enzyme was analyzed using SDS PAGE electrophoresis. It was discovered that its molecular weight is between 25 and 30 kDa. It was determined that the purified phospholipase C has a thermal optimum of 50°C, but the enzyme is not stable when it's exposed at higher temperatures for long periods. Its pH optimum is at pH 7 and the protein stays stable in the interval pH 7 – pH 8. Using the available genetic databases a set of primers was constructed for the isolation of the phospholipase C coding gene in *B. thuringiensis* № 17. It was confirmed that the gene has a length of 836 bp and is similar to genes coding phospholipases in *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, and other species.