

Bacillus megaterium в микробиологии для животноводства

Материал для сайта www.svetmix.com
Москва, 2019

Микробиология занимает в животноводстве стабильно важную позицию и находится в активном развитии, особенно это касается практической микробиологии. Так, уже более 50 лет промышленное производство аминокислот осуществляется при помощи биотехнологий. В том числе увеличивается значимость рынка аминокислот в производстве, ежегодные темпы роста составляют 5-7%. Развитие рынка было особенно динамичным для кормовых аминокислот, которые добавляют в комбикорма сельскохозяйственных животных и птицы — l-лизин, l-треонин и l-триптофан и другие. Аминокислоты получают в процессе ферментации с использованием высокоэффективных штаммов различных видов бактерий, например *Escherichia coli* в углеводных питательных средах из сахаров (патока, сахароза или глюкоза) [Leuchtenberger 2005]. По мере развития микробиологических технологий и изучения состава микрофлоры происходит открытие новых видов микроорганизмов-продуцентов полезных веществ, в том числе *Corynebacterium glutamicum* и *Bacillus megaterium* и других видов и штаммов.

B. megaterium относятся к бактериям-полипродуцентам. Их клетки способны вырабатывать множество веществ различной химической природы. Многие из них могут быть полезны, в том числе для многоклеточных живых организмов, включая сельскохозяйственных животных и человека. Вещества, которые вырабатывает *B. megaterium* — это сложные биомолекулы (пептиды, энзимы и др.) и простые вещества, такие как бутират, аспарат и глутамат.

B. megaterium - палочковидные, грам-положительные аэробные мезофильные спорообразующие бактерии с широким ареалом обитания, галофильные. Открытие бактерии принадлежит Антону де Бари (1884 год). Бактерия была названа "megaterium" (в пер. с греческого значит "большое животное") в связи со своим большим размером примерно в 100 раз больше, чем *E. Coli* длина палочек *B. megaterium* до 4 мкм, диаметр до 1,5 мкм. Величина генома *B. megaterium* - 5,8 мегабаз, содержание Г+Ц (37,5%), оптимум температуры 30-37°C. Эти микроорганизмы непатогенны в отношении растений, животных и человека и не вырабатывают в среду щелочных протеаз. Геном *B. megaterium* сохраняет стабильность в присутствии векторных конструкций. Сами микроорганизмы *B. megaterium* стабильны в широком диапазоне рН, что позволяет включать их в состав пробиотиков и кормовых добавок.

В общей сложности уже создано более 100 генетически охарактеризованных штаммов бактерии, векторов и плазмид для клонирования, а также около 10 стандартных полностью секвенированных плазмид [Vary 2016, 2010].

B. megaterium вместе с некоторыми другими видами рода *Bacillus*, в том числе *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*,

Brevibacillus brevis, and *Bacillus clausii* образуют очень ценную с индустриальной точки зрения группу микроорганизмов. Они обладают высокоэффективной системой синтеза и транспорта белков из клетки, растут на различных доступных и недорогих углеродных субстратах (не строго специфичны к субстрату).

B. megaterium выделяют из почвы и промышленных ферментеров. Они являются функциональным модельным микроорганизмом: создание рекомбинантных штаммов и направленная селекция *B. megaterium* перспективна для науки и биотехнологий, медицины, пищевой промышленности и сельского хозяйства (растениеводство и животноводство) [Wittman 2013, Eppinger 2011]. Метаболизм, биохимия и генетическая структура этой бактерии подробно описаны, что позволяет вести направленную работу с микроорганизмом с применением методов селекции, клонирования, геной инженерии и других наиболее современных технологий. При помощи такой направленной селекции можно создавать новые штаммы бактерии с повышенной активностью и/или продукцией требуемых веществ. С применением транскриптома, протеома и метаболома бактерии при помощи методов био-информатики проводятся исследования биосистем и построение био-моделей.

Вещества, которые вырабатывает *B. megaterium*, различны по своим свойствам и химической природе — это протеазы, антибиотики, пептиды, витамины, бактериоцины и ряд других соединений. В связи с этим, *B. megaterium* проявляет различные виды активности, в том числе:

- 1) антимикробную, антибиотик-подобную (вырабатывает различные виды бактериоцинов: липопептиды — сурфактины и лихеницины, итурин и фунгицины);
- 2) протеолитическую (продуцент протеаз — их в геноме насчитывается около 30 генов различных протеаз, в том числе несколько видов амилаз);
- 3) фунгицидную

Помимо перечисленных функций, *B. megaterium* является продуцентом витамина B12, сурфактантов и фермента пенициллин-ацилазы, который применяется в синтезе бета-лактамовых антибиотиков, в том числе синтетического пенициллина [Grafkova 2002]. Показана также эффективность применения *B. megaterium* как пробиотика, наряду с уже известными пробиотиками из микроорганизмов рода *Bacillus*.

Таким образом, из *B. megaterium* можно получать большое количество разнообразных целевых субстанций от плазмид и векторов до витаминов и био-добавок, причем не только качественно, но и количественно: штаммы *B. megaterium* в культуре обеспечивают хороший выход продуктов, при этом затраты на выращивание и культивацию этой бактерии сравнительно невысоки. Такие характеристики делают данный микроорганизм привлекательным как функционально, так и с точки зрения экономической рентабельности. *B. megaterium* обладает развитой системой транспорта и секреции метаболитов и нарабатывает их непосредственно в среду [Vary 2007, 2016].

Еще в 1982 году в работах Loshon C. A., Setlow P. была выделена и охарактеризована высокоактивная протеаза бактерии [Loshon 1982]. В литературе также описано несколько видов различных амилаз *B. megaterium* [David 1987]. В общей сложности в геноме *B. megaterium* содержится информация о более чем 30 различных протеазах, включая металлопротеазы, амилазы, аминопептидазы, нейтральные протеазы [Eppinger 2011].

Протеолитические ферменты, получаемые из *B. megaterium*, производятся в виде отдельных коммерческих препаратов, в том числе ведущими мировыми компаниями, такими как Merck (ранее SigmaAldrich), Megazyme и др. В том числе это амилаза, глюкозодегидрогеназа, глицеролдегидрогеназа, фосфотрансацетилаза.

Выращивание бактериальных продуцентов на специфических питательных средах позволяет получать штаммы, направленно продуцирующие те или иные вещества в большем количестве. Ввиду снижения рекомендуемых количеств добавления антибиотиков в комбикорма при выращивании сельскохозяйственных животных и птицы, значение пробиотиков и пребиотиков для практического животноводства возрастает, так как они совмещают в себе функции биологически активной и полезной для микрофлоры, пищеварения и продуктивности добавки и эффективной против патогенов бактерицидной субстанции. В том числе, возможно получение штаммов, которые продуцируют больше аминокислот. К ним относятся аспаргат- и глутамат-продуцирующие штаммы. К наиболее распространенным продуцентам этих аминокислот относятся *B. subtilis*, *Corinebacterium glutamicum*. Разрабатываются также новые штаммы других видов, в том числе бактерии-полипродуцента *B. megaterium*. В прикладной микробиологии для животноводства на основе таких селективных штаммов создаются пробиотики и пребиотики для сельскохозяйственных животных. *B. megaterium* является нативным хабитатом кишечной микрофлоры животных и птицы и наработка полезных метаболитов, в том числе аминокислот, происходит непосредственно в среде организма-хозяина.

Литература:

1. Макарец, Н.Г. Кормление сельскохозяйственных животных: Учебник для вузов. — 3-е изд., перераб. и доп / Н.Г. Макарец. — Калуга: Издательство «Ноосфера». — 2012. — 642 с.
4. David, M.H. Catalytic Properties of Bacillus Megaterium Amylase / M.H. David // Starch. — 1987. — Vol. 39(12) – P. 436—440.
5. Eppinger, M. Genome Sequences of the Biotechnologically Important *Bacillus megaterium* Strains QM B1551 and DSM319 / M. Eppinger et al. // Journal of Bacteriology. — August 2011. — Vol. 193(16) – P. 4199—4213.
6. Grafkova, J. Penicillin G acylase - synthesis, regulation, production / J. Grafkova, L. Sobotkova // Ceska Slov Farm. — January 2002. — Vol. 51(1) — P. 6-10.
8. Leuchtenberger, W. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects / W. Leuchtenberger, K. Huthmacher, K. Drauz // Appl Microbiol Biotechnol.— 2005. — Vol. 69. — No1. — <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0155-y>.
9. Loshon, C.A. Bacillus megaterium Spore Protease: Purification, Radioimmunoassay, and Analysis of Antigen Level and Localization During Growth, Sporulation, and Spore Germination / C.A. Loshon, P. Setlow P. // Journal of Bacteriology. — April 1982. — P. 303—311.

10. Storck, T. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)- dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain / T. Storck, S. Schulte, K. Hofmann, W. Stoffel // Proceedings of the National Academy of Sciences. — Nov. 1992. — Vol. 89 (22). — P. 10955—10959.
12. Vary, P.S. *Bacillus megaterium* — from simple soil bacterium to industrial protein production host // P.S. Vary, D. Jahn et al // Applied Microbiology and Biotechnology. — October 2007. — Vol. 76(5). — P. 957—967.
13. Vary, P.S. *Bacillus Megaterium* — Protein Production System / P.S. Vary // MoBiTec GmbH. — 2016. — 35 p.
14. Wittman, C. Getting the big beast to work — Systems biotechnology of *Bacillus megaterium* for novel high-value proteins / C. Wittman et al // Journal of Biotechnology. — January 2013. — Vol. 163(2). — P. 87—96.