

9. Abde K., Yamado T. J. Bacteriol., 149, 299, 1982.
10. Durgaryan S. S., Martirosou S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 5, 554, 1978.
11. Epstein W., Schultz S. G. In: Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-Form. Williams Wilkins, Baltimore, 1968, 186.
12. Erecinska M., Deutsch C. J., Davis J. S. J. Biol. Chem., 256, 278, 1981.
13. Helmer C. L., Laimins L. A., Epstein W. Membranes and Transp., Plenum Press, N. Y., London, 2, 123, 1982.
14. Henderson G. B., Potuznik S. J. Bacteriol., 150, 1098, 1982.
15. Markevics L. J., Jacques N. A. J. Bacteriol., 161, 989, 1985.
16. Martirosou S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 6, 315, 1979.
17. Martirosou S. M., Trchounian A. A. Ibid., 8, 25, 1981.
18. Martirosou S. M., Trchounian A. A. Ibid., 8, 597, 1981.
19. Martirosou S. M., Trchounian A. A. Ibid., 9, 459, 1982.
20. Martirosou S. M., Trchounian A. A. Ibid., 11, 29, 1983.
21. Martirosou S. M., Trchounian A. A. Ibid., 15, 417, 1986.
22. Orskov S. I. Acta Path. Microbiol. Scand., 25, 277, 1948.
23. Perry R. P. Annu. Rev. Biochem., 45, 605, 1976.
24. Puchkov E. O., Pinchukova V. A., Kosarev A. V. FEMS Microbiol. Lett., 13, 225, 1982.
25. Rhoads D. B., Epstein W. J. Gen. Physiol., 72, 283, 1978.
26. Rogosa M. J. Biol. Chem., 154, 307, 1944.
27. Solomon A. K. In: Proc. Intern. Biophys. Congress, Stockholm, 79, 1961.
28. Stewart L. M., Bakker E. P., Booth I. R. J. Gen. Microbiol., 131, 77, 1985.
29. Zarlengo M. H., Schultz S. G. Biochim. Biophys. Acta, 126, 308, 1966.

Поступило 25.IX 1986 г

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 4, 275—280, 1987

УДК 577.154.3

ИЗУЧЕНИЕ АЛЬФА-АМИЛАЗЫ БАЦИЛЛЯРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

А. В. ГАСПАРЯН, З. Г. АВАКЯН, Е. И. МАКАРОВА

Институт микробиологии АН Армянской ССР, г. Абовян

Аннотация — Выделен новый штамм *Bacillus subtilis*, являющийся высокоактивным продуцентом альфа-амилазы (декстринолитическая активность—475,0 ед/мг белка, сахараивающая—31,2 ед/мг белка). Изучены морфологические свойства штамма и некоторые условия биосинтеза фермента.

Անոտացիա — Անջատվել է *Bacillus subtilis* նոր շտամ, որը ալֆա-ամիլազա և քարաքանակալի պրոդուցենտ է (դեքստրինոլիտիկ 475,0 մ/մգ սպիտակուց, շաքարաքանակալի 31,2 մ/մգ սպիտակուց)։ Ուսումնասիրվել են շտամի մարֆո-ֆիզիոլոգիական հատկությունները և ֆերմենտի բիոսինթեզի որոշ պայմանները։

Abstract — A new strain of *Bacillus subtilis* has been isolated with a high activity production of alpha-amylase (dextrinolytic activity 475.0 u/mg protein, saccharifying activity 31.2 u/mg protein). Morpho-physiological properties and some conditions for biosynthesis of enzyme have been studied.

Среди многих продуцентов амилаз особое место занимает *Bacillus subtilis*, амилолитический комплекс которого имеет промышленное значение [1—3]. Широкое применение этих ферментов в народном хозяйстве диктует необходимость изыскания высокоактивных продуцентов, а также изучения и регулирования оптимальных условий биосинтеза, что и явилось целью настоящей работы.

Материал и методика. Объектом исследования служила культура *B. subtilis* (коллекция культур Института микробиологии АН АрмССР), выделенная в лаборатории спорообразующих бактерий.

Использовали следующие питательные среды: среда Раппа с соавт. [5], модифицированная измин среда Спенсер-Мартинс и Вэл-Удена [11], содержащие 1% крахмала. Последняя использовалась для изучения влияния источников азота и углерода на альфа-амилазную активность культуры. В качестве источника азота использовали аммонийные и нитратные соли, L-глутаминовую и L-аспарагиновую кислоты, L-метионин, мочевины и пептон, взятые в количестве, эквивалентном содержанию азота в сульфате аммония. В качестве источника углерода использовали крахмал, мальтозу, лактозу, фруктозу, глюкозу и маннит при содержании в среде 0.5% углерода.

Начальное значение pH сред 7.0.

Среды инокулировали односуточной культурой, выращенной на среде Раппа с соавт. [5], из расчета $4 \cdot 10^8$ клеток в мл культуральной среды.

Культивирование проводили в 250-миллилитровых колбах Эрленмейера, содержащих 40 мл среды, на качалках (200 об/мин) при 30° в течение 60 часов. Для определения амилолитической активности, количества выросшей биомассы и pH пробы отбирали через каждые 24 часа.

Биомассу высушивали при 80° до постоянной массы.

Альфа-амилазу характеризовали по декстринирующей и осахаривающей активностям грубоочищенного фермента.

Декстринирующую активность определяли колориметрическим методом по Рухлядовой [6]. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее расщепление 1 г растворимого крахмала при степени его гидролиза 30% за 10 мин при pH 5.5 и температуре 50° и выражали в единицах активности на мг белка.

Осахаривающую активность определяли колориметрическим методом по Рухлядовой [6], а редуцирующие вещества — Шомоды-Нельсона [8, 10]. За единицу активности принимали количество фермента, которое при pH 5.5 и температуре 50° катализирует образование из 1% крахмала 1 мг глюкозы за 1 час, и выражали в единицах активности на мг белка.

Альфа-амилазную активность изучали при pH 3.8—9.0 и температуре 30—80°.

Редуцирующие вещества в реакционной смеси определяли методом тонкослойной хроматографии в системе н-бутанол:уксусная кислота:вода (4:1:5), проявитель—раствор анилинфталата в водонасыщенном н-бутаноле.

Количество белка определяли по методу Лоурри [7].

Результаты и обсуждение. *B. subtilis*—продуцент альфа-амилазы—представляет мезофильную аэробную спорообразующую подвижную грамположительную бактерию, палочковидные клетки которой расположены одиночно и короткими цепочками с эндоспорами в середине, которые не раздувают ее.

Усваивает глюкозу, фруктозу, мальтозу, сахарозу, рибозу, трегалозу, раффинозу, инулин, лимонную кислоту; образует каталазу, желатиназу; гидролизует крахмал, пептонизирует молоко, восстанавливает нитраты, усваивает цитрат натрия.

Не усваивает ксилозу, рамнозу, галактозу, сорбозу, целлобиозу, сорбит, дульцит, инулин, салицин, щавелевую, малеиновую и олеиновую кислоты.

Растет при 7%-ном NaCl и pH 5,7. Ростовым фактором является биотин.

С целью выявления корреляции между процессами роста и биосинтезом альфа-амилазы амилазную активность изучали в динамике роста культуры. Данные, представленные на рис. 1, свидетельствуют об отсутствии прямой зависимости между удельной скоростью роста организма и скоростью синтеза фермента, что согласуется с современными представлениями о закономерностях синтеза гидролитических ферментов микроорганизмами [12].

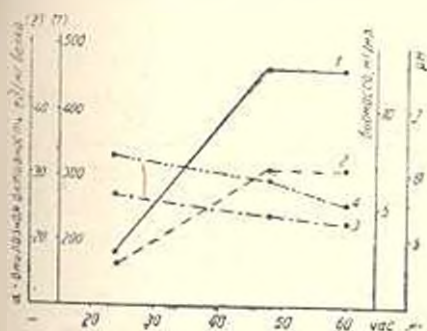


Рис. 1. Характеристики культуры *B. subtilis* в динамике роста. 1—декстринирующая активность, 2—осахаривающая активность, 3—биомасса, 4—pH.

Максимальная активность фермента достигается в конце стационарной фазы роста и составляет: 475,0 ед./мг белка—декстринирующая активность и 31,2 ед./мг белка—осахаривающая активность. Значение pH культуральной жидкости в это время снижается до 5,5—5,8. Максимальное количество биомассы (5,4 мг/мл) нарастает через 24 часа.

Хроматографический анализ показал, что в реакционной смеси происходит накопление лишь глюкозы, свидетельствующее о том, что изучаемый штамм является продуцентом альфа-амилазы, характеризующимся декстринирующей и осахаривающей активностями.

Из литературы известно, что для *B. subtilis* наиболее характерны амилазы, проявляющие максимальную активность при pH 5,5—6,3 и температуре 50—55° [1, 2]. Данные, полученные нами (рис. 2), свидетельствуют о достаточно высокой термостабильности полученного ферментного препарата. При температуре 50—60° альфа-амилазная активность практически не снижается, при температуре 70° остаточная декстринирующая активность составляет 55%, осахаривающая—25%, а при 80°—35 и менее 10% соответственно. Оптимальная температура каталитической активности 50—55°.

Опыты по изучению влияния pH на альфа-амилазную активность проводились в аналогичных условиях при температуре 50° и варьировании pH в пределах 3,8—9,0. Данные рис. 2 свидетельствуют о том, что оптимальное значение pH для обеих активностей находится в пределах 5,0—6,0. Высокая декстринирующая активность наблюдается и при pH 7,0, а при pH 9 обе активности резко снижаются. Характерно, что при

низких значениях pH альфа-амилазная активность находится на достаточно высоком уровне. Так, при pH 4,3 декстринирующая активность сохраняется на 50%-ном уровне, осажаривающая—на 25%-ном. На основании полученных данных можно заключить, что альфа-амилаза *B. subtilis* относится к кислотоустойчивым ферментам.

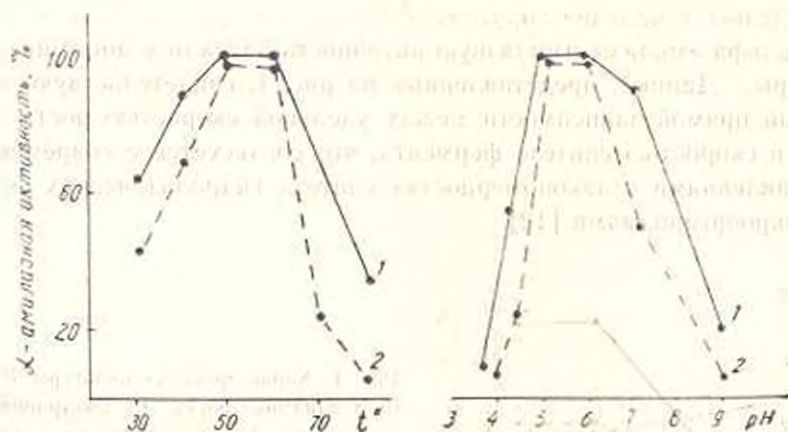


Рис. 2. Влияние температуры и pH на амилазную активность *B. subtilis*. 1—декстринирующая активность, 100% соответствует 180,0 ед/мг белка, 2—осажаривающая активность, 100% соответствует 16,26 ед/мг белка.

Влияние источников азота и углерода на альфа-амилазную активность *B. subtilis*

Источники азота и углерода	Альфа-амилазная активность, ед/мг белка	
	декстринирующая	осажаривающая
Источники азота		
(NH ₄) ₂ SO ₄	13.0	4.069
NH ₄ Cl	62.0	5.96
NH ₄ NO ₃	67.2	6.28
KNO ₃	100.0	10.44
NaNO ₃	100.0	10.44
Глутаминовая кислота	112.0	11.71
Аспарагиновая кислота	133.0	9.93
Метионин	66.0	4.48
Мочевина	66.0	4.72
Пептон	150.0	17.0
Источники углерода		
Крахмал	180.0	14.52
Мальтоза	200.0	14.93
Глюкоза	54.0	5.48
Фруктоза	146.0	10.96
Сахароза	100.0	8.65
Лактоза	116.0	8.96
Манинит	74.0	4.48
Олеиновая кислота	0	0
Крахмал + олеиновая кислота, 0,2%	136.0	9.82

Известно, что для разных представителей рода *Bacillus*, в том числе и *B. subtilis*, наилучшими источниками азота являются пептон, аммонийные, нитратные соли, мочевина и некоторые аминокислоты, а источниками углерода—крахмал, мальтоза. На других углеводах уровень биосинтеза фермента низкий [4].

Данные таблицы показывают, что из неорганических источников азота наиболее эффективным в отношении проявления альфа-амилазной активности является нитратный азот, а из органических — пептон, глутаминовая и аспарагиновая кислоты.

Наиболее приемлемым источником углерода для биосинтеза фермента являются мальтоза и крахмал, что согласуется с данными литературы. Достаточно высокая активность проявляется и на средах с фруктозой, лактозой и сахарозой, а низкая — с глюкозой и маннитом.

В литературе имеются данные о том, что интенсивный синтез амилотических ферментов у микроорганизмов происходит в присутствии источников углерода, имеющих определенное строение. Так, он в 2—10 раз протекает интенсивнее, если в питательную среду внести 1—15% веществ с числом атомов углерода ≥ 12 , типа насыщенных высших жирных кислот и их эфиров [9]. У изучаемого штамма *B. subtilis* олеиновая кислота в качестве единственного источника углерода не используется, а в виде добавки (0,2%) в среде с крахмалом ингибирует активность фермента.

Известно, что синтез альфа-амилаз у большинства микроорганизмов, в том числе у спорообразующих бактерий, находится под контролем индукции и катаболитной репрессии [4].

Данные о катаболитной репрессии и индукции синтеза альфа-амилазы у *B. subtilis* представлены на рис. 3. Опыты проводили на среде Спенсер-Мартинс и Ван-Удена [11] с 0,5%-ным пептоном. В 10 мл среды вносили 3,5 мг посевной культуры и культивировали на качалке в

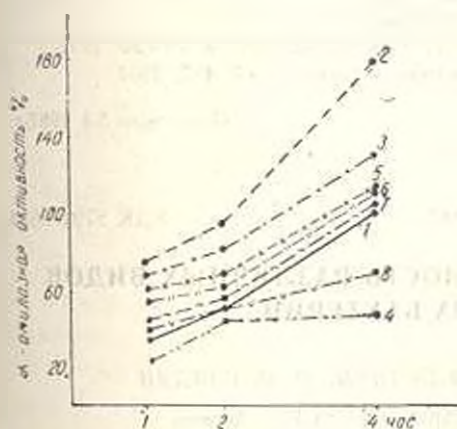


Рис. 3. Катаболитная репрессия и индукция синтеза α -амилазы у *B. subtilis*, 100%, активность соответствует 10 ед/мл белка по декстринирующей активности на среде без источника углерода за 4 ч индукции. 1 — без источника углерода; 2 — крахмал; 3 — мальтоза; 4 — глюкоза; 5 — фруктоза; 6 — лактоза; 7 — сахароза; 8 — маннит.

течение 4 часов. В качестве индукторов использовали различные углеводы и маннит. Контролем служила та же среда без углеводов и маннита, что позволило определить индуцирование синтеза фермента последними.

Результаты проведенных опытов указывают на то, что альфа-амилазу *B. subtilis* можно считать конститутивным ферментом, так как достаточно высокая активность проявляется на среде без углеводов; 55% по сравнению с активностью на среде с крахмалом. Крахмал и мальтоза являются индукторами фермента и повышают его активность в 1,8—1,3 раза. Фруктоза, лактоза, сахароза по индуцирующей силе значительно уступают мальтозе и крахмалу. Глюкоза и ман-

пит репрессируют синтез фермента. Наиболее сильным репрессором является глюкоза, что согласуется с литературными данными. Репрессирующий эффект маннита проявляется через 4 ч инкубирования, тогда как в первые часы он оказывает слабиндуцирующее влияние.

B. subtilis в незначительной степени подвержен катаболитной репрессии, что делает данный продуцент альфа-амилазы весьма эффективным для практического использования.

Таким образом, изучаемый штамм *B. subtilis* является продуцентом альфа-амилазы (К. Ф. 3.2.1.1), характеризующейся декстринизирующей и осахаривающей активностями. Активность данного штамма находится на уровне или несколько превышает таковую известных продуцентов [1—3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Авт. свид. СССР, № 841351А.
2. Авт. свид. СССР, № 1031681.
3. Глемжа А. А., Люджос Л. Л., Петрова Л. Н. Микробные ферменты в народном хозяйстве. 131, 132, 166, 170, Вильнюс, 1985.
4. Мурыгина В. П. Автореф. канд. дисс., М., 1985.
5. Рашап Р. К., Юшкайте Э. А., Глемжа А. А. Прикл. биохим. и микробиол., 2, 225—232, 1981.
6. Рухлядьева А. П., Полюгалова Г. В. Методы определения активности гидролитических ферментов. 58—62, 81—86, М., 1981.
7. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. D. J. Biol. Chem., 193, 1, 265, 1951.
8. Nelson N. G. J. Biol. Chem., 53, 1, 375, 1944.
9. Patent Specification LO32, 199, 1965.
10. Somogyi M. A. J. Biol. Chem., 195, 1, 19, 1952.
11. Spencer-Martins J. and van-Vliet N. Eur. J. Appl. Microb., 4, 29—35, 1977.
12. Terui G., Okazaki M., Kinoshita S. J. Ferment. Technol., 45, 497, 1967.

Поступило 5.1 1987 г.

Микробиол. ж. Армения, т. 40, № 4, 280—285, 1987

УДК 579.61.631

АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

А. Д. НАЛБАНДЯН, К. Г. АГАДЖАНИН, И. М. САДЯН

Институт микробиологии АН Армянской ССР, г. Ереван

Аннотация — Показано, что внесение в субстрат больших доз минерального азота (1,0 и 1,2 нормы) подавляет азотфиксирующую активность, эффективность и клубенькообразование у клубеньковых бактерий. Оптимальной дозой азота является 0,25 от полной нормы при 60%-ной влажности и pH почвы 7,2.

Азотфиксирующая активность и эффективность клубеньковых бактерий выше в фазе цветения растений.

Անոտացիա — Բացահայտված է, որ հանրային ազոտի 1,0 և 1,2 նորմաները (100,2 մգ համապատասխանաբար) ճնշում են պայարարակերիաների ազոտ ֆիքսելիս ակտիվությունը, ֆեկտիվությունը, պայարարաշագույնը, ռապիդալ և համարվում հանրային ազոտի լրիվ նորմայի 0,25 % (20,85 մգ), իդիալականության 60 % և pH-7,2 պայմանները: