

РАСПРОСТРАНЕНИЕ БЕТА-АМИЛАЗЫ У АЭРОБНЫХ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

А.В. ГАСПАРЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Изучено распространение бета-амилазы у культур разных видов аэробных спорообразующих бактерий. Выявлено, что синтез бета-амилазы преимущественно характерен для представителей видов *Bacillus polymyxa*, *B. cereus*, *B. mycoides*, а также *B. thuringiensis*. Установлено, что у культур подвидов *B. thuringiensis* бета-амилазная активность проявляется с наиболее выраженной альфа - амилазной активностью.

Ուսումնասիրված է բևուռ-տալիլազի տարածումը աէրոբ սպորոսպորանտ բակտերիաների տարբեր տեսակների կուլտուրաների մոտ: Բացահայտված է, որ բևուռ-տալիլազի սինթեզը առավելագույն բերքով է *Bacillus polymyxa*, *B. cereus*, *B. mycoides*, ինչպես նաև *B. thuringiensis* տեսակների ներկայացուցիչներին: Հսկայապատված է, որ *B. thuringiensis* սերանատուների կուլտուրաների մոտ բևուռ-տալիլազային ակտիվությունը նախկին 1 ցավա առավել արտահայտված ալֆա-տալիլազային ակտիվության հետ:

The distribution of beta - amylase activity in different species of spore-forming bacteria has been studied. The biosynthesis of beta - amylase was mainly distincted to the representatives of *Bacillus polymyxa*, *B. cereus*, *B. mycoides* and *B. thuringiensis*. The beta - amylase in strains of subspecies *B. thuringiensis* was revealed with more expressed alfa - amylase activity.

Аэробные спорообразующие бактерии бета-амилаза

Бета-амилаза (α-1,4-глюканмальтогидролаза, КФ 3.2.1.2.) - фермент, катализирующий гидролиз крахмала с образованием мальтозы, распространена у многих растений и различных групп микроорганизмов [8, 12]. Особый интерес представляют культуры аэробных спорообразующих бактерий, среди которых выявлены наиболее активные продуценты [4, 6, 8].

На основе использования высокоактивных штаммов - продуцентов бета-амилазы в ряде стран организовано ее промышленное производство, а вырабатываемые препараты успешно применяются в крахмало-паточной, кондитерской и других отраслях пищевой промышленности, в получении мальтозы и других продуктов [3, 7, 12].

В настоящей работе обобщены результаты систематического исследования распространения бета-амилазы среди хорошо идентифицированных культур разных видов спорообразующих бактерий,

причем ставилась задача характеристики в целом их амилолитической активности.

Материал и методика. Объектами исследований явились культуры разных видов аэробных спорообразующих бактерий из коллекции культур Института микробиологии НАН Армении (ИНМИА).

Для выращивания исследуемых культур использовали следующие питательные среды. Для мезофильных культур - среду КП (г/л): крахмал 10; пептон - 5.0; дрожжевой экстракт - 5.0; для термофильных культур - среду Бечинкой с соев. [2], а для алкалофильных культур - среду Хорикоши [9].

Среды инокулировали в количестве 5% односуточными культурами, выращенными на соответствующих агаризованных или жидких средах.

Культивирование мезофильных и алкалофильных культур проводили в колбах Эрленмейера емкостью 250 мл, содержащих 30 мл среды, на круговых качалках (200 об/мин) при 30° в течение 60 ч, а термофильных - при 56° 18 часов.

Амилазную активность определяли в супернатанте культуральной жидкости (кж).

О бета-амилазной активности судили по осаживающей активности, определяя в реакционной смеси образовавшиеся редуцирующие сахара методом Шомо-дья-Нельсона [10,11]. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует образование из 1 %-ного растворимого крахмала 1 ммоль мальтозы за 1 мин.

Декстринизирующую, или альфа-амилазную активность определяли колориметрическим методом по Рухлядовой [5]. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует расщепление 1г растворимого крахмала при степени его гидролиза 30% за 10 мин.

Мальтозу идентифицировали методом тонкослойной хроматографии в системе н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:3:3), проявитель - раствор анилинфталата. Продукты гидролиза крахмала определяли методом бумажной и тонкослойной хроматографии.

Результаты и обсуждение. Данные об амилолитической активности разных групп и видов бацилл, обобщенные в табл. 1.

Таблица 1. Амилолитическая активность культур разных видов бацилл

Виды и группы бактерий	Всего испытанных штаммов	Продуцируют амилазы	
		всего	в т.ч. активных
<i>Bacillus polymyxa</i>	23	23	13
<i>B. mycoides</i>	2	2	2
<i>B. cereus</i>	11	11	6
<i>B. thuringiensis</i> (серотип 1-19)	49	49	48
<i>Bacillus</i> sp.	13	0	0
Термофилы	4	4	4
Алкалофилы	10	10	1

свидетельствуют о широком распространении у них этих свойств, за исключением штаммов нового вида бацилл (*Bacillus* sp.).

Учитывая широкое распространение амилолитических свойств у культур энтомопатогенных бацилл *B.thuringiensis*, используемых в производстве бактериальных инсектицидов [1], нами была изучена декстринирующая и осахаривающая активность штаммов его различных разновидностей (серотипы 1-19).

Результаты опытов, представленные в табл. 2, показывают, что все культуры *B.thuringiensis*, обладают декстринирующей и осахаривающей активностью, причем у них более выражены декстринирующие, или альфа-амилазные свойства. Внутри отдельных разновидностей обнаруживается определенная вариабильность ферментативной активности. Можно отметить наличие более активных амилаз у разновидностей *thuringiensis*, *sotto - dendrolimus*, *caucasicus - darmstadiensis*, *galleriae* и сравнительно слабых - у разновидности *finitimus*.

Таблица 2. Декстринирующая и осахаривающая активность культур *B.thuringiensis* (реакционная смесь: 1 мл 1%-ного раствора крахмала; 0,5 мл кж. pH 7,0, 300 ; 10 мин)

Разновидности серотипы)*	Декстринирующая активность, ед/мл	Осахаривающая активность, ед/мл
<i>thuringiensis</i> -1	4,25	1,45
<i>finitimus</i> -2	0,02	0,013
<i>alesti-kurstaki</i> -3	1,70	0,25
<i>sotto-dendrolimus</i> -4	4,00	1,50
<i>galleriae</i> -5	3,95	1,00
<i>subtoxicus, entomocidus</i> -6	2,50	0,56
<i>azawai</i> -7	2,70	0,60
<i>tolworth</i> -9	2,70	0,62
<i>caucasicus-darmstadiensis</i> -10	4,00	1,20
<i>toumanoffi</i> -11	2,10	0,35
<i>thompsoni</i> -12	1,88	0,63
<i>pakistani</i> -13	3,80	1,00
<i>israelensis</i> -14	2,30	0,54
<i>dakota</i> -15	3,10	0,90
<i>indiana</i> -16	3,60	1,00
<i>tohokuensis</i> -17	3,30	0,78
<i>kumamotoensis</i> -18	3,60	1,00
<i>tochigiensis</i> -19	2,86	0,90

)* Представляются средние данные для каждого серотипа.

Как показывают данные табл. 3, близкородственные *B.thuringiensis* штаммы *B.mycoides* и *B.cerealis* характеризуются выраженной осахаривающей и слабодекстринирующей активностью. Как известно, *B.thuringiensis* от указанных видов бацилл отличается биосинтезом

энтомоцидных токсинов, хотя филогенетически и по своим морфофизиологическим свойствам они весьма близки [1]

Таблица 3 Декстринирующая и осажаривающая активность некоторых видов бацилл (реакционная смесь 1 мл 1%-ного раствора крахмала, 0,5 мл юк, 10 мин для мезофилов - pH 7,0 и 300; термофилов - pH 7,0 и 500; алкалофилов - pH 8,5 и 300,

Вид, группа бактерий *	Декстринирующая активность, эд/мл	Осахаривающая активность, эд/мл
<i>B. polymyxa</i>	0,2	3,5
<i>B. mycoides</i>	0,2	1,5
<i>B. cereus</i>	0,1	0,8
<i>Bacillus</i> sp. (термофилы)	15,5	1,25
<i>Bacillus</i> sp. (алкалофилы)	8,0	0,8

)* Представляются средние данные для каждого вида

Из таблицы 3 выявляется весьма интересная характеристическая особенность культур *B. polymyxa* - преобладание сильной осажаривающей активности над декстринирующей. Эта особенность, на наш взгляд, может явиться дифференцирующим признаком культур этого вида.

Изученные нами штаммы экстремофильных форм спорообразующих бактерий также обладают указанными свойствами (табл.3).

На материале выборочных типичных штаммов испытанных видов нами были проведены исследования по характеристике конечных продуктов ферментативного гидролиза крахмала. Подытоженные в табл. 4 результаты наших опытов выявляют наличие определенной специфики продуцирования амилаз у изученных видов бацилл.

У штаммов *B. polymyxa* среди продуктов гидролиза крахмала обнаружена только мальтоза, у штаммов *B. cereus*, *B. mycoides* - мальтоза и следы других олигосахаридов, что свидетельствует о наличии бета-амилазы. У культур *B. thuringiensis* среди продуктов гидролиза крахмала накапливаются мальтоза, глюкоза и некоторые олигосахариды. Можно предположить, что культуры указанного вида обладают комплексом амилаз, обуславливающих разнородность конечных продуктов. У штаммов 4-х термофильных и одной алкалофильной культур среди конечных продуктов гидролиза.

Таблица 4. Продукты гидролиза крахмала у разных видов бацилл (реакционная смесь: 2 мл 1%-ного раствора крахмала; 1 мл юж; определенный буфер pH 7.0; 8.5, температура 300, 500, 1 ч)

Виды бацилл	Количество штаммов	Обнаружены при ферментативном гидролизе крахмала			
		глюкоза	мальтоза	олигосахариды	циклические олигосахариды (циклодекстрины)
<i>B. pumilus</i>	7	-	+++	-	-
<i>B. cereus</i>	3	-	+++	следы	-
<i>B. thuringiensis</i>	2	-	+++	следы	-
<i>B. thuringiensis</i>	20	+	+	+	-
Термофилы	4	-	-	+	+++
Алкалофилы	1	-	-	+	+++

крахмала выявляются нередуцирующие вещества - циклические олигосахариды, или циклодекстрины.

Выполнение данной работы частично финансировалось грантами МНФ (Сороша) RY 1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3512

ЛИТЕРАТУРА

1. Адричян Э.К. Энтомопатогенные бактерии и их значение. Ереван, 1973
2. Бечина Е.М., Логинская Л.Г., Гернет М.В. Прикл биохим. и микробиол. 18, 5.640-646, 1982
3. Глемжа А.А., Люджос Л.Л., Петрова Л.И. Микробные ферменты в народном хозяйстве. Вильнюс, 1985
4. Рашап Р.К., Юшкяйте Э.А., Глемжа А.А. Прикл биохим. и микробиол. 17, 2.225-232, 1981
5. Рухляева П.П., Польшалина Г.В. Методы определения гидролитических ферментов. М., 1981
6. Филиппова И.Б., Посякова Л.С., Бедогарцев Ю.А., Кравченко Т.И. Ас 1613491, СССР, 1990
7. Фогарти В.М. Микробные ферменты и биотехнология. М., 1986
8. Fogarty W.M., Kelly C.T. Progress in Indust. Microbiol., 15, 87-150, 1979
9. Horikoshi K., Akiba T. Alkalophilic microorganisms: a new microbial world. Springer-Verlag, Berlin, 1982.
10. Nelson N.G.J. Biol.Chem., 53, 1, 375, 1944
11. Somogyi M.A.J. Biol. Chem., 195, 1, 19, 1952
12. Yamamoto T. (ed.) Handbook of amylases and related enzymes. Their sources, isolation methods, properties and applications. Tokyo, 1988

Поступила 7.IX.1994