

- 7 Chibata J Immobilized enzyme Tokyo, Koanasha, N.-Y. John Wiley . . . 1973.
8. Kakimoto T., Kato Y., Shibetani T. et al. J. Biol. Chem., 244, 353-358, 1969
- 9 Takamatsu S., Yamamoto K., Tosa T. et al. J. Ferment Technol. 59, 489-403, 1981
10. Tosa T., Sato T., Mori T. et al. Appl Microbiol., 27, 886-889, 1974

Поступила 05. IX 1994

Биолог. журн. Армении, 1 (48), 1995 г.

УДК 579.22:577.154

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ИНУЛИНАЗ У МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Л.А.ПИВАЗЯН, С.А.ДАВТЯН, Н.С.ХАЧАТУРЯН, Р.Н.ХАЧАТУРЯН, А.М.БАЛАЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Из инфицированных клубней топинамбура выделена и идентифицирована 21 культура грибов, 13 из которых обладали инулиназной активностью. Изучено усвоение различных источников углеродного питания. Установлено, что большинство из них хорошо усваивают инулин. Отобраны 3 активных продуцента инулиназ и определены оптимальные значения их ферментативной активности. У этих штаммов максимальная инулиназная активность проявляется при 50°. Оптимум pH у штаммов T-6 и T-1 равен 5, у T-18 - 7,0.

Գնանախնճորի վարակված սրբարներից մեկուսացված և իդենտիֆիկացված են սնկերի 21 կուլտուրաներ, որոնցից 13-ը օժտված են ինուլինազային ակտիվությամբ: Որոշված է, որ նրանց մեծ մասը լավ յուրացնում են ինուլինը և ֆրուկտոզը: Ոճարված են ինուլինազների 3 ակտիվ արտադրիչներ և որոշված են նրանց ֆերմենտատիվ ակտիվության օպտիմալ նշանակությունները:

3 շտամների մոտ մաքսիմալ ինուլինազային ակտիվությունը դրսևորվում է 50°-ում: pH-ի օպտիմումը T-6 և T-1 շտամների մոտ հավասար է 5-ի, իսկ T-18-ի - 7:

The 21 cultures of fungi were isolated and identified from the infected tubers of topinambur, among which 13 cultures have possessed the inulinase activity. The assimilation of inulin and fructose by the most cultures studied was revealed. Three active inulinase-producers were selected and the optimal values of enzymatic activity were determined.

The maximal inulinase of these strains was appeared at 50°. The optimal pH for strain T-6 and T-1 is 5, for T-18 is 7.

Грибы микроскопические - инулиназа - инулин - топинамбур.

Инулиназы, или инулингидролазы - ферменты, специфически гидролизующие бета -1,2-связи инулина [3]. Культуры-продуценты выделяются в основном из почв или скринингом среди коллекционных культур [5,7].

Целью настоящего исследования было выделение и изучение микроскопических грибов-продуцентов инулиназ из инфицированных клубней топинамбура.

Материал и методика. Объектами исследований явились культуры грибов, выделенных из инфицированных клубней топинамбура сорта "Интерес-2" урожая весны 1993г. из Аштаракского района. Выделение грибов проводили методом накопительных культур. Части клубней помещали в колбы Эрленмейера с 50 мл воды и инкубировали на качалке 2 ч при 28°. После 24-часовой выдержки в комнатных условиях делали высев на чашки Петри со средой Чапека следующего состава (г/л): NaNO_3 - 2,0; KH_2PO_4 - 1,0; KCl - 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; FeSO_4 - следы; сахара - 30,0; агар-агар - 20,0; pH до стерилизации 6,0-6,5; стерилизация 15 мин при 1,0 атм. Выделенные и очищенные культуры хранили на агаризованной среде того же состава.

Инулиназную активность определили в реакционной смеси, содержащей 1 мл культуральной жидкости (кж) и 1 мл 2,5 % -ного раствора инулина в 0,1 М ацетатном буфере с pH 4,7 при 50°. За единицу активности принимали количество фермента, образующее 1 мкмоль фруктозы за 1 мин в условиях опыта.

Количество редуцирующих сахаров определяли методом Сомоджи-Нельсона [4]. Идентификацию грибов проводили на основании комплекса культуральных и морфологических признаков по известным определителям [1,2,3].

Результаты и обсуждение. Из клубней топинамбура выделен 21 штамм грибов. Грибы отнесены к видам *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *Penicillium palitans*, *P. cyclospium*, *Fusarium heterosporum*, *F. gibbosum*, *Chaetomium waltkei*, *F. javanicum*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus oryzae*, *Mucorales* sp. Большинство изученных видов и родов описано ранее как продуценты инулиназ [9]. Однако в описаниях продуцентов не встречались такие, как *P. palitans*, *P. cyclospium*, *A. terreus*, *F. heterosporum*, *Mucorales* sp.

Полученные результаты показали, что культуры грибов в качестве источников углерода в той или иной степени используют все классы углеводов. По интенсивности использования сахаров на первом месте стоят глюкоза и фруктоза. Большинство культур хорошо растут на раффинозе и мелецитозе. На усваиваются многими культурами сорбоза, рамноза, лактоза, дульцит, маннит. Салицин используется только культурой *Aspergillus niger* шт. Т-6. Этот штамм использует также винную, молочную, фумаровую кислоты. Инулин усваивается большинством выделенных культур.

Внеклеточную инулиназную активность культур изучали в динамике в течение 12 суток роста на жидкой среде Чапека. В качестве источника сахара были использованы по 0,5% сахарозы и инулина. Результаты исследований, представленные в табл. 1, показывают, что на среде с сахарозой у большинства штаммов

инулиазная активность или очень слабая или не проявляется. Многими исследователями показано неоднозначное влияние источников углерода на проявление инулиазной активности. Так, для *Kluyveromyces fragilis (marxianus)* наиболее низкий уровень продуцирования инулиназы получен на сахарозе, по сравнению с инулином, сорбитом, раффинозой, фруктозой [6]. Ровенхорст с соавт. [7] для *K. marxianus* CBS 6556 показали, что на среде с фруктозой, которая является первейшим индуктором инулиназы [6], культура образует вдвое меньше инулиназы, чем на среде с сахарозой.

Таблица 1. Динамика проявления инулиазной активности культур (инкубация на среде Чапека, 28°C, культивирования на качалке).

Виды и штаммы	Инулиазная активность, ед/мл ж. спустя (сутки)							
	с 0,5% инулина				с 0,5% сахарозой			
	3	5	7	10	3	5	7	10
<i>Penicillium politanus</i> T-1	1,0	1,8	1,2	1,0	0	0	0,05	0
<i>P. cyclopium</i> T-18	0,8	1,2	0,9	0,9	0	0	0	0
<i>Penicillium</i> sp. T-12-1	0	0,3	0,5	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i> T-4(1)	0	0,04	0,08	0	0	0	0	0
<i>A. flavus</i> T-7	0,01	0,04	0,3	0	0,04	0,04	0,04	0,01
<i>A. terreus</i> T-20	0,12	0,6	0,6	0,08	0	0	0	0
<i>A. niger</i> T-6	0,2	0,9	1,15	1,12	0	0	0,02	0,3
<i>Fusarium heterosporum</i> T-10	0,04	0,04	0,04	0,23	0,05	0,01	0,01	0
<i>Fusarium</i> sp. T-16	0,2	0,33	0,26	0,15	0	0	0	0
<i>Mucorales</i> sp. T-11	0	0,23	0,18	0	0	0	0	0

Следует отметить, что характер роста, спорообразование и накопление биомассы на обеих средах у большинства изученных нами культур идентичны. Различия в проявлении инулиазной активности на средах с инулином и сахарозой носит скорее штаммовый характер, чем видовой. Так, у *F. heterosporum* T-10 сравнимые показатели инулиазной активности на обеих средах, а *Fusarium* sp. T-16 при сравнении с предыдущим штаммом активности на среде с инулином на среде с сахарозой таковую не проявляет. Таковы же результаты в вариантах с *A. flavus* T-4(1) и *A. flavus* T-7.

Из 21 выделенной из топинамбура культуры грибов 13 обладали инулиазной активностью, что говорит о целесообразности отбора продуцентов из инфицированных клубней топинамбура.

инулиназная активность или очень слабая или не проявляется. Многими исследователями показано неоднозначное влияние источников углерода на проявление инулиназной активности. Так для *Kluyveromyces fragilis (marxianus)* наиболее низкий уровень продуцирования инулиназы получен на сахарозе, по сравнению с инулином, сорбитом, раффинозой, фруктозой [6]. Ровенхорст с соавт. [7] для *K. marxianus* CBS 6556 показали что на среде с фруктозой, которая является первейшим индуктором инулиназы [6], культура образует вдвое меньше инулиназы, чем на среде с сахарозой.

Таблица 1. Динамика проявления инулиназной активности культур (инкубация на среде Чапека, 28°C, культивирование на качалке)

Виды и штаммы	Инулиназная активность, ед/мл ж. сгустья (сутки)							
	с 0,5% инулина				с 0,5% сахарозы			
	3	5	7	10	3	5	7	10
<i>Penicillium palitans</i> T-1	1,0	1,8	1,2	1,0	0	0	0,05	0
<i>P. cyclospium</i> T-18	0,8	1,2	0,9	0,9	0	0	0	0
<i>Penicillium</i> sp. T-12-1	0	0,3	0,5	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i> T-4(1)	0	0,04	0,08	0	0	0	0	0
<i>A. flavus</i> T-7	0,01	0,04	0,3	0	0,04	0,04	0,04	0,01
<i>A. terreus</i> T-20	0,12	0,6	0,6	0,08	0	0	0	0
<i>A. niger</i> T-6	0,2	0,9	1,15	1,12	0	0	0,02	0,3
<i>Fusarium heterosporum</i> T-10	0,04	0,04	0,04	0,23	0,05	0,01	0,01	0
<i>Fusarium</i> sp. T-16	0,2	0,33	0,26	0,15	0	0	0	0
<i>Mucorales</i> sp. T-11	0	0,23	0,18	0	0	0	0	0

Следует отметить, что характер роста, спорообразование, накопление биомассы на обеих средах у большинства изученных нами культур идентичны. Различие в проявлении инулиназной активности на средах с инулином и сахарозой носит скорее штаммовый характер, чем видовой. Так, у *F. heterosporum* T-10 сравнимые показатели инулиназной активности на обеих средах, а *Fusarium* sp. T-16 при сравнимой с предыдущим штаммом активности на среде с инулином на среде с сахарозой такую не проявляет. Таковы же результаты в вариантах с *A. flavus* T-4(1) и *A. flavus* T-7.

Из 21 выделенной из топинамбура культуры грибов 13 обладали инулиназной активностью, что говорит о целесообразности отбора продуцентов из инфицированных клубней топинамбура.

Инулиназная активность на среде с инулином у многих штаммов независимо от вида и рода грибов, проявляется в различные сроки роста. Так у ряда штаммов (*F. raifans* T-1, *P. cyclospium* T-18, *A. niger* T-6) уже на 3-и сутки роста отмечается инулиназная активность. Инициальная активность сохраняется на достаточно высоком уровне и на 12 сутки, когда завершена стационарная фаза роста.

Неактивны или незначительно активны как штаммы *Rhizopus*, *F. gibbosum*, *Chaetomium waltkei*.

Более подробно изучены 3 активных продуцента инулиназы - *Aspergillus niger* T-6, *Penicillium raifans* T-1, *P. cyclospium* T-18 на первоначальном уровне сохранившиеся инулиназную активность после года хранения.

Исследовано влияние температуры и реакции среды на инулиназную активность отобранных штаммов (табл. 2,3).

Таблица 2. Влияние температуры на инулиназную активность культур грибов (субстрат - 1% инулина в 0,1 М ацетатном буфере - рН 4,7)

Температура, °С	Относительная активность, %		
	<i>P. raifans</i> шт T-1	<i>P. cyclospium</i> шт T-18	<i>A. niger</i> шт. T-6
30	50,3	36,4	28,2
40	70	90	62
50	100	100	100
60	86	77	97
70	25,6	23	3,4
80	20	0	1,25

Оптимум температуры для 3 видов - 50°. Но достаточно высокий уровень активности сохраняется и при 60°, уменьшаясь при этом на 3,0; 14,0 и 23,0%, соответственно для штаммов T-6, T-18 и T-1.

Если изменение температуры оказывает почти одинаковое действие на инулиназную активность испытанных культур, то влияние рН не носит такого характера. Оптимум рН одинаков и равен 5,0 у штаммов T-6 и T-1 *Aspergillus* и *Penicillium*, а у штаммов T-1 и T-18 рода *Penicillium* разница в оптимуме рН составляет 2 единицы. *P. raifans* T-1 проявляет активность в пределах рН от нейтрального к кислому, а *P. cyclospium* от нейтрального к щелочному. *A. niger* T-6 проявляет активность в более широких пределах рН.

Таблица 3. Влияние pH реакционной смеси на инулиназу активность (субстрат-1% инулин, 500; pH 3-5, 0,1М ацетатный буфер, pH 6-8-1/15М, фосфатный буфер, pH 9 - 0,2 М NaOH - лициновый буфер)

pH	Относительная активность, %		
	<i>P. pallans</i> ш.Т-1	<i>P. cyclospium</i> ш.Т-18	<i>A. niger</i> ш.Т-6
3	42,4	8,7	26
4	42,4	8,7	90
5	100	43,6	100
6	68	70	70
7	54,5	100	56
8	40	60	0,8
9	-	28	-

Работа частично финансировалась грантами МНФ (Сорос) RY1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3512 .

ЛИТЕРАТУРА

1. Билэй В.И., Коваль Э.З. Аспергиллы (определитель). К., 1988
2. Коваль Э.З. Определитель зитомпатогенных грибов СССР. Киев, 1974.
3. Наумов Н.А. Фитопатология. М.-Л., 1935.
4. Рухлядева А.П., Полюгалина Г.В. Методы определения гидролитических ферментов. М., 1981.
5. Fuhla K., Koyohara, Hashimoto H., Kishata S. Agric. Biol. Chem. (Japan), 54, 4, 913-919, 1980
6. Groot Wassink I.W.D. Hawill G.H. J gen. Microbiol., 29, 31-41, 1983.
7. Rauwenhorst R.J., Visser L.E., Van der Vann A.A., Snelfois W.A., J.P. Van Ducken, Appl. Environ. Microbiol., 5, 1131-1147, 1983.
8. Snyder H.E., Phaff H.J. J. Biol. Chem., 237, 2438-2441, 1962.
9. Vandamme E.J., Derycke D.G. Adv. appl. Microbiol., 29, 139-176, 1983.

Поступила 2.X.1994