

## АСПОРОГЕННЫЙ ШТАММ БАЦИЛЛА - ПРОДУЦЕНТ ИНУЛИНАЗЫ

З.Г.АВАКЯН, Н.А.АЙВАЗЯН, Э.К.АФРИКЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Получен аспорогенный мутант культуры *Bacillus licheniformis* с высокой инулиназной активностью 4500 ед/г клеток, что в 10 раз превышает активность исходного штамма. Изучены физиолого-биохимические особенности мутанта и условия биосинтеза фермента инулиназы.

Ստացված է *Bacillus licheniformis*-ի բարձր ինուլինազային ակտիվությամբ (4500 մ/գ բջիջ) ապոսպորացն ճրտանատ, որը սկզբնական շառնի ակտիվությունը գերազանցում է 10 անգամ: Ուսումնասիրված են ճրտանատի ֆիզիոլոգիա-բիոքիմիական հատկանիշները: Բնութագրվել է ֆերմենտի կենսասինթեզի օպտիմալ պայմանները:

The asporogenous mutant of *Bacillus licheniformis* with high inulinase activity (4500 u/g cells) has been obtained exceeding about 10-fold over the activity of the original strain. Physio-geo-biochemical properties and the optimal conditions for biosynthesis of enzyme have been studied.

### Инулин - инулиназа - бациллы

Продуценты инулиназы широко распространены среди раз-ных групп микроорганизмов: бактерий, грибов и дрожжей [1-3]

У бацилл - продуцентов инулиназы в процессе спорообразо-вания снижается ферментативная активность. И чем интенсивнее этот процесс, тем слабее инулиназная активность.

Целью настоящей работы являлось получение аспорогенного мутанта с высокой инулиназной активностью.

**Материал и методика** Объектом исследования служила культура *Bacillus licheniformis* шл. ИНМИА-1911 из коллекции культур микроорганизмов Института микробиологии НАН Армении.

В качестве мутагена применяли N - нитрозогуанидин (НГ). Для получения аспорогенного мутанта отцентрифугированную биомассу 4-часовой культуры дважды промывали в фосфатном буфере с pH 7,0. После промывки биомассу из расчета  $10^8$  кл/мл вносили в раствор, содержащий 1 мг/мл НГ. Экспозиция - 30 и 60 мин при температуре  $40^{\circ}$ , после чего проводился рассев на чашки Петри со средой следующего состава (%):

пептон - 1,0; дрожжевой экстракт - 0,5; инулин - 0,1. После 48-72 ч инкубации микроскопированием выросших колоний отбирали аспорогенные варианты.

Инулиназную активность определяли по методу Сэмоджи-Нельсона [4]. В качестве реакционной смеси использовали раствор 1 %-ного инулина. За единицу активности принимали количество фруктозы (мк моль), образовавшейся при конверсии 1 г инулина одним граммом биомассы в течение одного часа при 40° в условиях качалки.

**Результаты и обсуждение.** В результате воздействия НГ на культуру *B. licheniformis* получен аспорогенный мутант с высокой инулиназной активностью.

Сравнительная характеристика инулиназной активности различных групп микроорганизмов показала, что активность полученного нами аспорогенного мутанта значительно выше активности исходного штамма и других культур микроорганизмов (табл.1).

**Таблица 1. Инулиназная активность различных групп микроорганизмов**

Группы и штаммы микроорганизмов	Инулиназная активность, мкмоль/час/г сырой биомассы
Мутант <i>B. licheniformis</i>	4500
<i>Kluyveromyces fragilis</i> шт.3884	1300
<i>B. licheniformis</i> шт.1911	200
<i>Aspergillus candidus</i> шт.43(7)	780
<i>B. subtilis</i> шт.1722	160

Изучено влияние различных источников углерода, азота и микроэлементов на инулиназную активность аспорогенного мутанта. Ксилоза и целлобиоза являются индукторами при биосинтезе инулиназы (табл.2). Биосинтез фермента стимулируют органические виды азота (табл.3). Из микроэлементов инулиназную активность повышают ионы  $Ca^{++}$  и  $Mg^{++}$  (табл.4)

**Таблица 2. Влияние источников углерода на инулиназную активность (сахара добавлялись из расчета 1 %)**

Источники углерода	Инулиназная активность, мкмоль/час/г сырой биомассы
Ксилоза	1260
Глюкоза	926,4
Целлобиоза	1223
Сахароза	630
Галактоза	1000
Маннит	445
Мальтоза	593
Инулин	1260

Оптимальная температура расщепления инулина - 50°, pH 6,5-6,0. Изучение культуральных, морфофизиологических и биохимических особенностей спорогенного мутанта показало, что они в основном не отличаются от исходного штамма.

**Таблица 3.** Влияние источников азота на инулиназную активность (концентрация по азоту 0,3 %)

Источники азота	Ферментативная активность, мкмоль/час/г сырой биомассы
KNO <sub>3</sub>	22
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	29
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	185
Мочевина	166
Гидролизат казеина	1593
Пептон	1704

**Таблица 4.** Влияние различных микроэлементов на инулиназную активность (концентрация ионов 0,001М, иона кальция 0.01%)

Микроэлементы	Инулиназная активность, мкмоль/час/г сырой биомассы
Контрольная среда без ионов	500,3
Zn <sup>++</sup>	685,5
Mg <sup>++</sup>	1222,8
Ca <sup>++</sup>	2593,8
Fe <sup>++</sup>	449,2
Co <sup>++</sup>	
Cu <sup>++</sup>	

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Авакян Э.Г., Айвазян Н.А., Африкян Э.К. Биолог. журн. Армении, 41, 5, 1988.
2. Bajon A.M., Guiraud Z.P., Biotechnol. Bioeng., 25, 1983.
3. Beluche G., Guiraud Z.P. Folia Microbiol., 25, 32, 1980.
4. Sontogy M.Z. Biol. chem., 195, 1951.

Поступила 8.XI.1994