

ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫЕ ФОРМЫ БАЦИЛЛ КАК АКТИВНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ЦИКЛОДЕКСТРИН ГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ И β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ

О.А. ПАНОСЯН*, П.В. ТОЗАЛАКЯН**, А.В. ГАСПАРЯН***

**Ереванский государственный университет,
кафедра микробиологии и биотехнологии, 375025*

***Научно-исследовательская компания "Геориск", 375019, Ереван*

****Республиканский Центр депонирования микробов НАН Армении, 378510, Абовян*

The screening of active producers of cyclodextrin glucanotransferase and β -galactosidase of extremophilic bacilli isolated from some regions with thermal and geochemical anomalies of Armenia has been carried out.

β -галактозидаза - циклодекстрин глюканотрансфераза - экстремофильные формы бацилл

В последние годы экстремофильные микроорганизмы служат объектами многочисленных исследований по экологии, систематике, метаболизму и биосинтезу физиологически активных соединений [2, 4, 7, 12, 13]. Особая значимость этих микроорганизмов связана с возможностью разработки на их основе качественно новых высокоэффективных биотехнологий [3].

Несмотря на многочисленные исследования, проведенные в этой области, обнаружение природных экстремофильных микроорганизмов и выявление среди них штаммов-продуцентов ферментов, имеющих важное промышленное значение, в частности цикломальтодекстрин глюканотрансферазы (ЦГТ-аза) и β -галактозидазы, по-прежнему остается актуальной задачей [1, 3, 8, 9].

В связи с этим проведена специальная серия исследований для изыскания новых перспективных продуцентов ЦГТ-аз и β -галактозидаз у ранее выделенных нами различных культур экстремофильных (термофильных, алкалофильных, галофильных и термогалофильных) бацилл.

Материал и методика. Объектами исследования явились ранее выделенные нами экстремофильные формы бацилл из разных субстратов (почва, вода и ил), отобранных из участков с термальными и геохимическими аномалиями на территории Армении (Дилижан, оз. Севан и его бассейн, Армавир) [6]. Термофилы выращивали на пептон-кукурузной среде [4] при 56°, алкалофилы – на среде Хорикоши [12] с рН среды 9-10 при 37°, а галофилы и термогалофилы – на специальной среде [13] с содержанием 12% NaCl при 37° и 56°, соответственно. Штаммы на основании морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств идентифицированы до вида с помощью диагностических ключей определителя Берге [10] и с учетом характеристик этих бактерий в первоисточниках [4, 12]. Эти штаммы включены в коллекцию культур микроорганизмов кафедры микробиологии и биотехнологии ЕГУ и научно-исследовательской компании "Геориск".

С целью облегчения поиска новых, более эффективных продуцентов ЦГТ-аз использовали экспресс-метод скрининга, позволяющий прямо на агаризованной среде в процессе роста культуры осуществить их специфическое обнаружение. Метод основан на

том факте, что циклодекстрины (ЦД) могут образовывать комплекс с определенными индикаторами, уменьшая, таким образом, интенсивность окрашивания [9].

Определение наличия кристаллов комплекса йод-ЦД в жидких средах с крахмалом проводили микроскопированием по методу Тильдена-Хадсона [14]. Образующиеся ЦД в реакционной смеси определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе *n*-бутанол - уксусная кислота - вода (4:3:3). Хроматограммы проявляли раствором анилинфталата в водонасыщенном *n*-бутаноле и газообразным йодом.

Определение ЦГТ-азной активности в культуральной жидкости проводили колориметрическим методом [11]. За единицу ЦГТ-азной активности принимали количество фермента в культуральной жидкости, которое в оптимальных условиях за 10 мин конвертирует 50% крахмала.

Для определения β -галактозидазной активности исследуемые культуры высевали на подобранные для каждой из форм *Bacillus* специфические среды, содержащие 1% лактозы [8]. Биомассу отделяли центрифугированием при 5000g в течение 15-20 мин. Активность β -галактозидазы определяли колориметрическим методом, используя в качестве субстрата *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (ONPG) фирмы "SERVA". Реакционную смесь, состоящую из 10 мг биомассы (сырой вес), 0,5 мл дистиллированной воды и 0,5 мл 0,05% ONPG, инкубировали в соответствующих условиях в присутствии толуола. β -галактозидазную активность определяли при 420 нм [5]. За единицу активности принимали такое количество биомассы, которое гидролизует 1 мкмоль субстрата в минуту при оптимальных условиях.

Результаты и обсуждение. Идентификация выделенных штаммов позволила ориентировочно отнести их к следующим видам: *Bacillus licheniformis* subsp. *thermophilus* (Т-8, Т-18), *B. licheniformis* subsp. *halotermophilus* (Т-Г-28), *B. subtilis* subsp. *thermophilus* (Т-М-Б), *B. stearothermophilus* (Т-17, Т-25), *B. alcalophilus* (А-Х-2, А-Д-2,), *B. sphaericus* (А-2, А-Д-5).

Для выявления активных продуцентов β -галактозидазы и ЦГТ-азы проведен скрининг более 44 штаммов. Наиболее ярко выраженной β -галактозидазной активностью обладают термофилы (13 штаммов), алкалофилы (6 штаммов) и один термогалофильный штамм. Среди изученных штаммов активными продуцентами ЦГТ-аз являются 22 термофильных, 3 алкалофильных, 1 галофильный и 1 термогалофильный штаммы. Более того, среди термофилов встречаются штаммы (Т-8, Т-18), которые обладают как ЦГТ-азной, так и β -галактозидазной активностями (табл. 1).

Таблица 1. Наличие ЦГТ-азной и β -галактозидазной активностей у экстремофильных *Bacillus*

Экстремофильные группы штаммов	Число изученных	Число активных штаммов по ЦГТ-азе	Число активных штаммов по β -галактозидазе
Термофилы	25	22	13
Алкалофилы	16	3	6
Галофилы	1	1	0
Термогалофилы	2	1	1

Микроскопирование образцов культуральной жидкости показало, что термофильные штаммы образуют смесь α -, β - и γ -ЦД, но преобладающим является α -ЦД, в то время как алкалофильные и галофильные штаммы продуцируют в основном β -ЦД (табл. 2). Это подтверждается данными,

полученными методом ТСХ. Таким образом, выделенные нами штаммы отличаются специфичностью действия, превращая крахмал в смесь всех трех ЦД в различных пропорциях, что согласуется с литературными данными [1, 12].

Количественное определение ЦГТ-азы выявило наличие значительной активности среди термофилов (Т-2, Т-7, Т-8, Т-28). Алкалофильные (А-20, А-21, А-22) и галофильные (Т-Г-23, Т-24) штаммы тоже обладают высокой ЦГТ-азной активностью. Однако по общей активности наиболее перспективным является термофильный штамм Т-8.

Таблица 2. ЦГТ-азная и β-галактозидазная активность некоторых экстремофильных бацилл

Наименование видов	ЦГТ-азная активность, ед/мл кж	β-галактозидазная активность, ед/г биомассы
Термофилы		
<i>Bacillus sp.</i> (Т-2)	755	-
<i>Bacillus sp.</i> (Т-7)	750	1500
<i>B. licheniformis</i> (Т-8)	785	2600
<i>B. stearothermophilus</i> (Т-17)	231	-
<i>B. licheniformis</i> (Т-18)	291	555
<i>B. stearothermophilus</i> (Т-25)	110	2590
<i>B. licheniformis</i> (Т-28)	650	-
<i>B. subtilis</i> (Т-М-В)	368	-
Алкалофилы		
<i>Bacillus sp.</i> (А-20)	313	1100
<i>Bacillus sp.</i> (А-21)	155	930
<i>Bacillus sp.</i> (А-22)	133	575
<i>B. sphaericus</i> (А-2)	-	2850
<i>B. alcalophilus</i> (А-D-2)	155	-
<i>B. sphaericus</i> (А-D-5)	185	-
<i>B. alcalophilus</i> (А-X-2)	-	125
Термогалофилы		
<i>Bacillus sp.</i> (Т-Г-23)	306	-
<i>B. licheniformis</i> (Т-Г-18)	-	530
Галофил		
<i>Bacillus sp.</i> (Г-24)	315	-

Как видно из табл. 2, определение β-галактозидазной активности у ряда термофильных (Т-8, Т-25) и алкалофильных (А-2) штаммов позволило установить эту способность в пределах 2600-2800 ед/г сырой биомассы.

Некоторые из изученных микроорганизмов могут быть рекомендованы микробиологической промышленности как продуценты активных ЦГТ-аз при получении ЦД, а другие, - в качестве продуцентов активных β-галактозидаз, при получении безлактозного молока или различных подсластителей на основе лактозы.

Авторы выражают благодарность сотрудникам РЦДМ ак. Э.Г. Африкяну, А.А.Хачатурян и З.Г.Авакян за оказанную помощь при выделении и тестировании штаммов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абелян В.А.* Циклодекстрины: получение и применение. 519, Ереван, Ван Арьян, 2001.
2. *Кашнер Д.* Жизнь микробов в экстремальных условиях. 519, М., Мир, 1981.
3. *Квеситадзе Г.И.* Ферменты микроорганизмов, живущих в экстремальных условиях: 42-е Баховское чтение. 54, М. Наука, 1990.
4. *Логинава Л.Г., Егорова Л.А.* Новые формы термофильных бактерий. 295, М. Наука, 1966.
5. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. М., Мир, 1976.
6. *Паносян О.А.* В кн.: Материалы III республиканской молодежной научной конференции. 102-107, Ереван, 2002.
7. *Хачатурян А.А., Казанчян Н.Л., Хачатурян Н.С., Адамян М.О., Хачикян Л.А.* Биолог. журн. Армении, 48, 1, 12-18, 1995.
8. *Читчян К.В., Хачатурян А.А.* Биолог. журн. Армении, 48, 1, 39-42, 1995.
9. *Avakian Z.G., Khachatryan A.A., Davidyan T.S., Adamyan M.O.* Biolog. J. Armenia, 53, Special issue: Cyclodextrins, 245-249, 2001.
10. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Eds. Sneath P.H.A., Mair M.S., Sharpe M.E., Holt J.G. Williams and Wilkins Co. - Baltimore, 2th ed., 2, 1104-1139, 1986.
11. *Hale W.S., Rawlins L. C.* Cereal Chem., 28, 1, 49-58, 1951.
12. *Horikoshi K., Akiba T.* Alkalophilic microorganisms - a new microbial world. Tokyo, Berlin, Heidelberg, New York. Springer-Verlag, 213, 1982.
13. *Larsen H.* In: The procariots, 1, 985-994, 1981.
14. *Tilden E.B., Hudson C.S. J.* Bacteriol., 43, 2, 527-544, 1942.

Поступила 01.XII.2002