

Биолог. журн. Армении, 4 (55), 2003

УДК 577.154.31

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ РОДА *BACILLUS* С ИНУЛИНАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Г.В. МАРТИРОСЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г.Абовян

Из различных образцов почв выделены 25 мезофильных штаммов рода *Bacillus* с инулиназной активностью. Изучены два наиболее активных продуцента, которые относятся к *B.subtilis* и *B.megaterium*. Штаммы обладают высокой инулиназой и инвертазной активностью и могут быть рекомендованы к применению в промышленных условиях.

Հողերի տարբեր նմուշներից անջատվել են ինուլինազային ակտիվությամբ օժտված *Bacillus* ցեղին պատկանող 25 մեզոֆիլ շտամեր: Դետումնասիրվել են երկու առավել ակտիվ արտադրիչները, որոնք պատկանում են *B.subtilis* և *B.megaterium* տեսակներին: Շտամերն ունեն բարձր ինուլինազային և ինվերտազային ակտիվություն և առաջարկվում են օգտագործելու արտադրական պայմաններում:

25 mesophilic strains of genus *Bacillus* have been isolated from different soil samples. Two the most active strains were identified as *B.subtilis* and *B.megaterium* and their properties were investigated. Due to the high inulinase and invertase activities they can be applied in industry.

Bacillus - инулиназа -инулин- фруктозо-глюкозный сироп-инвертаза-сахароза.

В настоящее время все большее внимание уделяется сахарам природного происхождения, так как синтетические заменители, такие как сахарин, цикламат натрия и др. [2] небезопасны для организма человека. В качестве подсластителя особый интерес представляют фруктозо-глюкозный сироп (ФГС) [11, 12], высококонцентрированный фруктозный сироп (ВКФС) и фруктоолигосахариды (ФОС) [10, 13, 14], получаемые из инулина под воздействием инулиназ микробного происхождения. Эти вещества отличаются отсутствием калорийности и могут свободно использоваться диабетиками; не обладают кариогенностью, так как не утилизируются со стороны *Streptococcus mutans*, следовательно, не образуют кислоты и нерастворимые глюканы [13]; снижают уровень холестерина в крови [5] и имеют все свойства пребиотиков — веществ, которые не перевариваются в верхних отделах кишечного тракта, но усваиваются бифидобактериями, способствуя их росту, опосредованно ингибируя рост патогенных бактерий в толстом кишечнике, тем самым нормализуя кишечную микрофлору [4].

Инулин — полифруктан, находящийся во многих растениях, особенно у представителей семейства сложноцветных [6], состоящий из фруктозы, в

котором фруктозные остатки связаны β -2,1-связями, оканчиваясь остатком глюкозы. Полисахаридная цепочка инулина состоит из 25-35 фруктозных остатков. Инулиназы (2,1- β -D фруктан фруктангидролазы) (КФ 3.2.1.7) [15] - индуцибельные ферменты, которые катализируют гидролиз инулина посредством расщепления β -2,1-связей в молекуле [7]. По характеру воздействия на субстрат инулиназы подразделяются на экзо- и эндоферменты. Экзоферменты расщепляют инулин с одного конца, с высвобождением остатка фруктозы из молекулы инулина. Имеются также микроорганизмы, обладающие эндоинулиназами, которые расщепляют молекулу инулина на олигофруктаны, в основном на инулотриозы, -тетрозы и -пентозы, 1-кестозу, нистозу и 1'-фруктофуранозил нистозу [13,15]. Фермент по характеру размещения может быть внутри- и внеклеточным.

Получение ФГС и олигофруктанов с помощью фермента инулиназы или биомассы продуцентов протекает в один этап без побочных продуктов. В зависимости от вида конечного продукта используется определенный тип фермента.

Микробные инулиназы воздействуют и на инулин, и на сахарозу. Истинной инулиназой называется тот фермент, у которого инвертазная активность (S) по отношению к инулиназной (I) (S/I) не превышает 10-15 [9].

В данной статье дана сравнительная характеристика роста культур, продукции фруктозы в зависимости от условий культивирования. Благодаря целенаправленному поиску, получены новые штаммы, которые можно использовать для расщепления как инулина, так и сахарозы с получением ФГС.

Материал и методика. Объектами исследования явились культуры М11 и М14, выделенные из почвенных образцов.

Для выделения и обогащения их были использованы следующие среды (г/л):

среда 1: инулин — 5, дрожжевой экстракт — 5, пептон — 10; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2, агар — 20, pH 6,8;

среда 2: инулин — 20, дрожжевой экстракт — 10, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2, pH 6,8.

Стерилизация проводилась при 121° 20 мин. Инулин стерилизовали отдельно при 110° 15мин и асептически добавляли в основную среду.

Культуры выделяли методом накопительных культур, а именно исследуемую почву в количестве 3 г суспендировали в 1%-ном растворе инулина в дистиллированной воде и выдерживали в термостате две недели, периодически обновляя среду. После двух недель каплю этой суспензии наносили штрихом на чашки Петри со средой 1 и инкубировали при 37° в течение суток.

Получение чистых культур. Выросшие колонии суспендировали в дистиллированной воде, разводили до 1:1000, полученную суспензию высевали методом Дригальского и повторяли процесс 3 раза до получения гомогенных культур, определяемых под микроскопом.

Глубинное культивирование штаммов осуществляли в 200-миллилитровых колбах Эрленмейера с 30 мл среды в течение 18 ч при 37° на качалке.

Идентификацию культур проводили по известным первоисточнику [8] и определителю [3].

Аналитические методы. После 18 ч инкубирования биомассу отделяли, промывали 0,12M Na/K- фосфатным буфером (pH 6,8) и удаляли избыток жидкости под инфракрасной лампой. Ферментативную активность культуральной жидкости и клеток определяли по модифицированному методу Шомоди-Нельсона при длине волны 620nm. В качестве контроля брали 1%-ный раствор инулина или сахарозы, растворенных в 0,12M Na/K-фосфатном буфере. Образование конечных продуктов определяли по отношению к 1%-ному раствору инулина или сахарозы в 0,12 M Na/K-фосфатном буфере при pH 6,8.

Количественное определение общих сахаров проводили антроном методом. Количество фруктозы и глюкозы определяли с помощью ферментных китов фирмы Boehringer-Mannheim, термо- и pH-стабильность - по методике [1]. За единицу активности принимали количество (мкМ) редуцирующих веществ, образовавшихся в единицу времени.

Результаты и обсуждение. Из 25 мезофильных культур, выделенных из различных почвенных образцов и обладающих инулиназной активностью, были отобраны два штамма с высокой инулиназной и инвертазной активностью. Они обладали внутриклеточным ферментом и условно обозначены М11 и М14.

Характеристика полученных штаммов. В результате изучения морфолого-культуральных и физиолого-биохимических особенностей выявлено, что выделенные культуры М11 и М14, продуценты инулиназ, относятся к видам *B.subtilis* и *B.megaterium* соответственно. Ниже приводятся их морфо-физиологические характеристики.

Штамм М11. Выделен из почвы Канакерского района г. Еревана. Строго аэробные, подвижные, палочковидные клетки, размерами 0.6-0.8 x 2-3 мкМ, грамположительные. Споры овальные, парацентральные, не раздувают спорангий.

Образует колонии неправильной формы с неровными краями, грязно-белые, матовые, плоские, по периферии гладкие центральная часть с шероховатостями. Хорошо растет на инулине, сахарозе, фруктозе, крахмале, казеине, образует кислоту из глюкозы, арабинозы, ксилозы, не образует кислоту из маннита. Не гидролизует гиппурат, не утилизирует цитрат и пропионат. Оптимальная температура роста 37°, температурные пределы роста 25-55°.

Штамм М14. Выделен из почвы Чарбахского района г. Еревана. Строго аэробные, подвижные, палочковидные клетки, размерами 1.2-1.5 x 2-4 мкМ, в цитоплазме есть неокрашиваемые включения. Грамположительные. Споры овальные, центральные и парацентральные, раздувают спорангий.

Колонии округлые, диаметром 0.5-0.8 см, края ровные, гладкие, центральная часть с характерным бугорком, колонии серо-белые, блестящие, с радиальной исчерченностью от центрального бугорка.

Хорошо растет на инулине, сахарозе, фруктозе, крахмале, казеине, образует кислоту из глюкозы, арабинозы, ксилозы, маннита, не гидролизует гиппурат, не утилизирует цитрат, пропионат.

Оптимальная температура роста 30°, температурные пределы роста 15-45°.

Основные характеристики изученных штаммов представлены в табл. 1.

Ферментативные особенности штаммов. Оба штамма обладают внутриклеточными инулиназами, являющимися экзоферментами, которые расщепляют также сахарозу, т.е. обладают и инвертазными свойствами. Зависимость инулиназной активности этих культур от pH и температуры и ее стабильность при этих показателях представлены на рис. 1-4. Необходимо отметить, что у этих продуцентов максимум инулиназной активности совпадает или чуть превышает температурный максимум роста. Для М11 максимальная активность составляет 1245 ед. и проявляется при температуре 50° и pH 5.5, а для М14 - 498 ед. при температуре 50° и pH 7.0.

Таблица 1. Характеристика исследованных мезофильных культур аэробных спорообразующих бактерий-продуцентов инулиназ

Признаки	<i>Bacillus subtilis</i> штамм М11	<i>Bacillus megaterium</i> штамм М14
Форма клеток	Палочковидные	Палочковидные
Размер клеток, мкм	0.6-0.8 x 2-3	1.2-1.5 x 2-4
Форма спор	Эллипсоидные	Эллипсоидные
Расположение спор	Парацентральное	Центральное и парацентральное
Подвижность	+	+
Образование каталазы	+	+
Анаэробный рост	-	-
Температурные пределы роста, °С	23-50	15-45
Рост в присутствии NaCl, %		
5	+++	+++
7	++	++
10	+	+
Кислота из		
глюкозы	+++	+++
арабинозы	+++	+++
ксилозы	+++	+++
маннита	-	++
Гидролиз		
крахмала	+ _{0.5}	+ _{0.5}
гиппурата	-	-
Утилизация цитрата	-	-
Денитрификация	+	+
Разложение казеина	+++	+++
Окраска по Граму	+	+
Реакция Вогес-Проскауера	-	-
Образование дигидроксиацетона	-	+
Гидролиз тирозина	-	-
Газ из глюкозы	-	-
Дезаминирование фенилаланина	-	+
Рост при pH 5.7	+	+

Условные обозначения: "+" - признак имеется, "-" - признак отсутствует.

Как видно из рис. 3 и 4, М11 при выдержке в течение 1ч сохраняет 50-55.4% остаточной активности от общей при pH 7.5-8.5, а М14 - 43.3% при pH 5.5. Зависимость от температуры более жесткая: М11 сохраняет 12-15,1% остаточной активности при 25-37°, а М14 - 39.4% при 25-40° соответственно.

Штаммы обладают также высокой инвертазной активностью. Отношение S/I у М11 составляет 1.47 и 1.57 у М14. Вследствие закономерного спада инулиназной и инвертазной активности обоих штаммов при определении термо- и pH-стабильности можно предположить, что у них за активность отвечает один и тот же фермент.

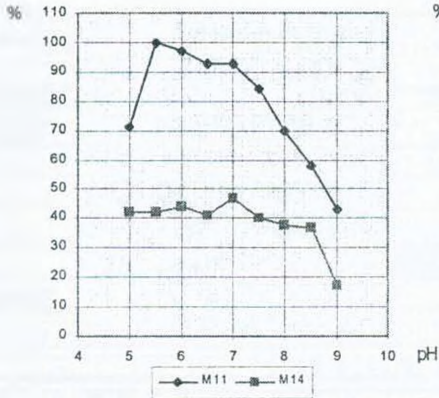


Рис. 1. Инулиназная активность штаммов M11 и M14 при различных значениях pH.

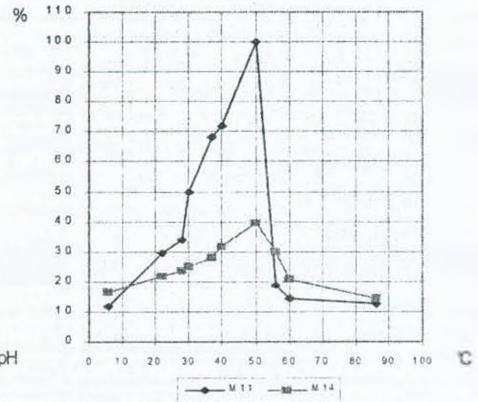


Рис. 2. Инулиназная активность штаммов M11 и M14 при различных значениях температур.

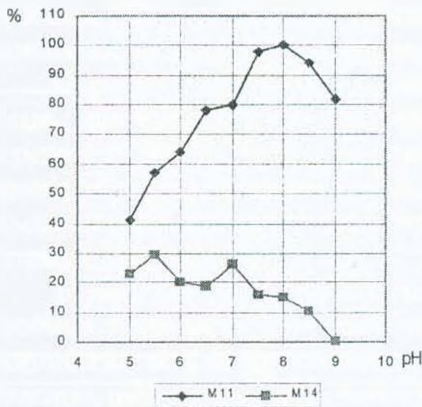


Рис. 3. pH стабильность штаммов M11 и M14.

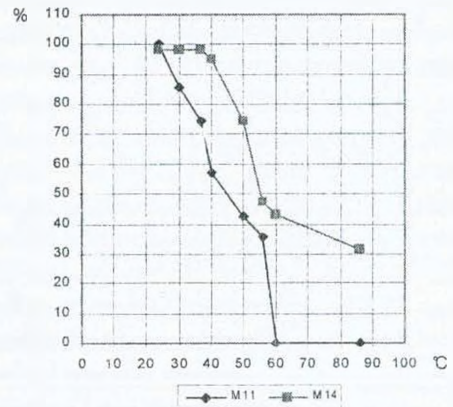


Рис. 4. Термостабильность штаммов M11 и M14.

Таким образом, с использованием модифицированной среды для целенаправленного выделения штаммов с инулиназной активностью из 20 образцов почв были получены 25 штаммов аэробных спорообразующих бактерий. Из них отобраны 2 штамма с высокой активностью в 1245ед. у M11 и 498ед. у M14. Штаммы обладают также инвертазной активностью. Оба штамма обладают внутриклеточным ферментом. Исходя из представленных результатов, изученные штаммы могут быть рекомендованы для использования в промышленных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абеян В.А. Получение и применение иммобилизованных ферментов и клеток. Ереван, 1989.
2. Мартиросян Г.В., Балаян А.М., Манукян Л.С., Абеян В.А. Мат-лы VIII Международной конф. "Центральные и периферические механизмы вегетативной нервной системы", 12, 1, 41, 2003.
3. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams and Wilkins Co.,

- Baltimore, 2, 1104-1139, 1986.
4. *Biacs Peter A.* "9-th Seminar on Inulin. Prebiotics and Probiotics ", Bay Zoltan Foundation for Applied Research, p.8, Budapest, Hungary, 2002.
5. *Ciealik E., Kopea A., Praznik W.* "9-th Seminar on Inulin. Functional properties of fructans", Department of Human Nutrition Agricultural University of Cracow, p.12, Budapest, Hungary, 2002.
6. *Demeulle S., Guiraud J-P. and Galzy P. S. Z. Allg. Microbiol.*, 21, 181-189, 1981.
7. *Esteban B-F., Mariano G-G., Lorena G-R., Azaola A.* *Process Biochem.*, 37, 513-519, 2001.
8. *Gordon R.E., Haysnes W.C., Pang C.H.W.* "The Genus *Bacillus*". USD of Agriculture, Washington D.C., 283, 1973.
9. *Gupta A.K., Gill A., Kaur N.* *Phytochemistry*, 49(1), 55-58, 1998.
10. *Jun J.W., Kim D.H., Uhm T.B., Song S.K.* *Biotechnol. Letts.*, 19(9), 935-938, 1997.
11. *Kim C.H., Rhee S.K.* *Biotechnol. Letts.*, 11(3), 201-206, 1989.
12. *Partida V.Z., Lopez A.C., Gomez A.J.M.* PN, WO 9734017 dt. 18/9/97, 1997.
13. *Won J.Y.* *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 107-117, 1996.
14. *Yokota A., Yamauchi O., Tomita F.* *Lett. Appl. Microbiol.*, 21(5), 330-333, 1995.
15. *Zittan L.* *Starch*, 33, 373-377, 1981.

Поступила 11.XI.2003