



Биолог. журн. Армении, 1 (67), 2015

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАЦИЛЛ – ПРОДУЦЕНТОВ ИНУЛИНАЗ

Л.С. МАНУКЯН, Н.А. АНДРЕАСЯН, К.Б. АФЯН, В.Т. КОЧИКЯН

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА
armbiotech@gmail.com

Выделены в чистую культуру термофильные штаммы-продуценты инулиназы и на основании морфофизиологических и биохимических характеристик идентифицированы как представители *Geobacillus stearothermophilus* и *Bacillus polymyxa*.

Geobacillus – Bacillus – инулиназы – термофильные бациллы

Անջատվել և բնութագրվել են ինուլինազների թերմոֆիլ մանրէարտադրիչներ և մորֆոֆիզիոլոգիական, կենսաքիմիական բնութագրերի հիման վրա նույնականացվել որպես *Geobacillus stearothermophilus* և *Bacillus polymyxa*:

Geobacillus – Bacillus – ինուլինազներ – թերմոֆիլ բացիլներ

Strains-producers of inulinase thermophilic bacteria have been isolated in pure culture and identified on the basis of morpho-physiological and biochemical characteristics as representatives of *Geobacillus stearothermophilus* and *Bacillus polymyxa*.

Geobacillus – Bacillus – inulinases – thermophilic bacilli

Инулиназы (2,1-β-D фруктан – фруктаногидролазы КФ 3.2.1.7) расщепляют инулин и другие фруктаны (фруктоолигосахариды) до фруктозы.

Возросший интерес к инулиназам вызван перспективами их использования для получения фруктозо-глюкозного сиропа, синтеза олигосахаридов, а также биоэтанола из инулинсодержащего сырья, в основном топинамбура и цикория [2, 6].

Продуценты этого фермента широко распространены среди различных видов микроскопических грибов, дрожжей и бактерий [1, 3, 4, 9].

Бактериальные организмы исследованы сравнительно слабо, хотя представляют большой практический интерес, особенно их экстремофильные формы [8].

Целью нашей работы являлось выделение, характеристика и идентификация термофильных бактерий – продуцентов инулиназы.

Материал и методика. В качестве основной питательной среды использовали следующий состав (%): инулин – 2; дрожжевой экстракт – 0.2; NaNO₃ – 0,05; KН₂РO₄ – 0,05; MgSO₄ – 0,05; KCl – 0,05; FeCl₃ – 0,001, (рН 7,0; инкубация при 65°С).

Для окрашивания клеток применяли методику окраски по Граму, споры красили по методу Ожешки, жгутики – по способу Леффлера в модификации Пешкова [5].

Морфологию клеток и спор у выделенных культур изучали с помощью микроскопа Leica DM 500 trinocular (x1000) и программного обеспечения Digital Camera EC3 Leica Microsystem (x10).

Идентификацию выделенных культур бактерий проводили по определителю Берджи [7].

Результаты и обсуждение. Предварительные опыты показали, что для целенаправленного выделения культур-продуцентов инулиназ наиболее эффективным является использование метода накопительных культур на среде, содержащей инулин в качестве единственного источника углерода.

Образцы почв, взятые из различных эколого-географических регионов Армении, помещали в стерильную воду в соотношении 1:3, отстаивали и использовали в качестве инокулята. Накопительные культуры получали в аэробных условиях при 65°С. Инкубирование проводили в течение 3-4-х суток, после чего высевали на чашки Петри с агаризованной средой следующего состава (%): инулин – 2,0; дрожжевой экстракт – 0.2; NaNO₃ – 0,05; KН₂РO₄ – 0,05; MgSO₄ – 0,05; KCl – 0,05; FeCl₃ – 0,001, (рН 7,0). После трехкратной очистки посевом на агаризованные среды выделены в чистую культуру три термофильных штамма-продуцента инулиназ (Т-21, Т-13, Т-79). Изучены их морфологические и физиолого-биохимические признаки.

Культура Т- 21: Грамположительные палочковидные, одиночные, подвижные клетки размером 0,7-0,8 x 2,5-4,0 мкм; образующие эллипсоидные эндоспоры, расположенные терминально, раздувающие клетку. На агаризованной среде образует крупные округлые колонии диаметром 3–4 мм, матовые, кремовые. Поверхность колоний гладкая, профиль – плоский, край колоний ровный, структура – однородная. На жидкой среде культура Т-21 образует сплошную толстую, складчатую, всплывающую пленку кремового цвета (рис. 1).

Культура Т-13: Грамположительные палочковидные, одиночные, подвижные клетки размером 0,6-0,9 x 2,5- ,5 мкм, образующие сферические эндоспоры, расположенные терминально, раздувающие клетку. На агаризованной среде образует округлые колонии диаметром 3 мм, блестящие, кремовые. Поверхность колоний шероховатая, профиль выпуклый, край колоний волнистый, структура однородная. Эта культура на жидкой среде образует сплошную тонкую, гладкую, всплывающую пленку кремового цвета (рис. 2).

Культура Т-79: Грамположительные палочковидные, одиночные, подвижные клетки размером 0,6-0,8 x 2,0-5,0 мкм, образующие эллипсоидные эндоспоры, расположенные центрально, не раздувающие клетку. На агаризованной среде образует бесцветные колонии диаметром 4 мм. Поверхность колоний шероховатая, профиль выпуклый, край колоний волнистый, структура мелкозернистая. На жидкой среде культура Т-79 образует кольцеобразную, толстую, гладкую, всплывающую пленку (рис. 3).

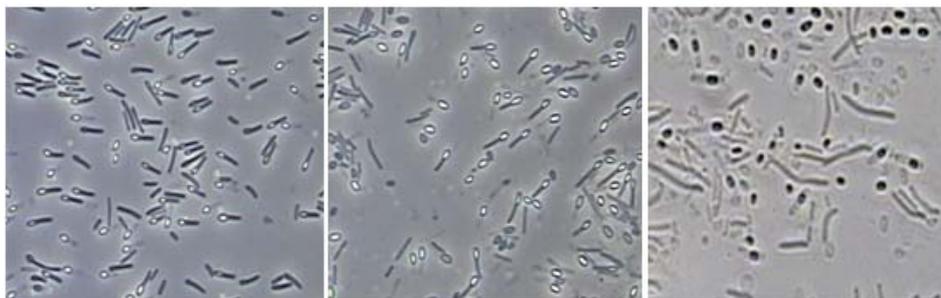


Рис.1. *G. stearothermophilus* T – 21 **Рис. 2** *G. stearothermophilus* T – 13 **Рис. 3** *Bacillus polymyxa* T – 79

Изучение выделенных термофильных культур показало, что они имеют в целом близкие физиолого-биохимические свойства: отрицательные реакции на образование индола, ацетилметилкарбинола, использование цитрата и пропионата в качестве источника углерода; положительные реакции на образование каталазы, дигидроксиацетона, гидролиз инулина и денитрификацию. Показана вариабельность культур в образовании кислоты и газа из глюкозы, арабинозы, ксилозы и маннита. Культуры характеризуются наличием протеолитической и лецитиназной активности и отсутствием уреазной. Они не усваивают тирозин, не гидролизуют эскулин, не растут в присутствии 5% NaCl, сероводород образует только культура T – 21. В качестве источников углерода используют ксилозу, рамнозу, арабинозу, маннозу, глюкозу, галактозу, мальтозу, сахарозу, трегалозу. Не усваивают лактозу, дульцит, сорбит, меллибиозу, салицин, фумаровую и янтарную кислоты.

Таким образом, из различных почвенных образцов выделены термофильные продуценты инулиназ. На основании морфофизиологических и биохимических характеристик две культуры идентифицированы как *Geobacillus stearothermophilus* (T–21, T–13); а одна – *Bacillus polymyxa* (T–79).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абелян В.А., Манукян Л.С.* Характеристика экзоинулиназ *Kluveromyces marxianus* и *Bacillus licheniformis*. Биохимия, 61, 6, с. 1028-1036, 1996.
2. *Балаян А.М., Кочикян В.Т., Манукян Л.С., Андреасян Н.А., Афян К.Б., Дюкова К.А.* Разработка технологического процесса получения этилового спирта из инулинсодержащего сырья. 2-я Меж. науч. конф. молодых ученых „Вклад молодого поколения в развитие биотехнологии„ Ереван РА, 1-4 октября, с. 14. 2013.
3. *Балаян А.М., Пивазян Л.А., Хачатурян А.А., Африкян Э.К., Абелян В.А.* Инулиназы *Penicillium palitans* и *Penicillium cyclospium*. Биохимия, 61, 5, с. 895-902, 1996.
4. *Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Таха А.С.* Исследование некоторых параметров иммобилизованной инулиназы из *Kluveromyces marxianus* как перспективного катализатора реакции гидролиза инулина. Биотехнология, 2, с. 55-59, 2009.
5. *Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М.* Практикум по микробиологии., М., Издательский центр „Академия„, 608 с., 2005.
6. *Afrikan E.G.* Topinambur: bioenergetic and biomedical potential. Annals of Agrarian Science, Tbilisi, Georgia, 10, 2, pp. 24-30, 2012.
7. *Bergey,s Manual of Systematic Bacteriology.* Second Edition, Volume Three, The Firmicutes, Editors: Whitman W.B., Parte A.C., London New York, Springer Dordrecht Heidelberg, p. 1450, 2009.
8. *Kato K., Araki T., Kitamura T., Norita N., Moori M., Suzuki Y.* Purification and properties of a thermostable inulinase (β -D-fructan fructohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP 1289. Starch, 51, pp. 253-258, 1999.
9. *Nakamura T., Maruki S., Nakatsu S., Ueda S.* General properties of an extracellular inulase from *Aspergillus niger*. Nippon Nogei Kagakukaishi, 52, p. 581, 1978a.

Поступила 19.09.2014