

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ СОХРАНЕНИЯ МАТЕРИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ АСПАРТАЗЫ И АСПАРТАТ- БЕТА-ДЕКАРБОКСИЛАЗЫ

С.Н. БАГДАСАРЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510 г. Абовян

На материале 4 штаммов-продуцентов аспартазы и аспарат-бета-декарбоксилазы разработаны эффективные методы длительной консервации и условий репродукции, обеспечивающие высокую жизнеспособность и специфическую ферментативную активность штаммов. Установлена значительная вариабильность как жизнеспособности так и ферментативной активности клеток-продуцентов в зависимости от используемых методов хранения, консервации и реактивации.

Наиболее эффективным способом длительной консервации штаммов с поддержанием их исходной активности является хранение в жидком азоте. Продуценты из разных групп бактерий требуют специфических условий хранения и консервации.

Ասպարտազի և ասպարտատի դեկարբոքսիլազի արտադրիչները 4 շտամների վրա հիմնված են եզրագրային արևմտահայկերեն և վերամերիկացուհի սպորոնոմադիկ մարմիններ, որոնք տարբերվում են շտամների բարձր կենսական ակտիվության և ֆերմենտատիվ ֆերմենտացիոն տիպիվորությունը:

Հարսնադրված է ինչպես կենսակենսաբան, այնպես էլ ասպարտազի և ասպարտատ-բետա-դեկարբոքսիլազ արտադրիչների բնական շտամային տարբերության փոխվող ազդեցությունը կախված պահպանման պայմաններից, կենսակենսաբան և սեռակրթացման մեթոդներից:

Շտամների երկարատև պահպանման և նախաժամ տարբերության ապահովման համար արդյունավետ է կամարված կեղանի տարիվ պահպանումը:

Տարբեր բակտերիալ խմբերի արտադրիչներ պահպանում են տրեպոնոման և ստրեպտոկոկալ յուրահատուկ պայմաններ:

The efficient methods for long-term conservation and reproduction of ten amino-producers of aspartase and aspartate-beta-decarboxylase activity have been worked out.

The variability of enzymatic activity of the cells-producers of aspartase and aspartate-beta-decarboxylase depends on the methods of keeping, conservation and reactivations.

The liquid nitrogen is the effective method of conservation for maintenance of the initial activity of the strains.

The producers from different group of bacteria need the special environments of the conservation.

Микроорганизмы - хранение и консервация штаммов

Методы микробиологического катализа и трансформации получили широкое распространение для получения разнообразных биологических соединений, в том числе оптически активных аминокислот [7-10]. В ряде стран организовано промышленное производство L-аспарагиновой кислоты и L-аланина с использованием

аспартазы и аспартат-бета-декарбоксилазы [1-5]. Вместе с тем методы хранения и репродукции штаммов продуцентов указанных ферментов изучены недостаточно

Нами разработана оптимальная питательная среда для выращивания и сохранения высокой ферментативной активности культур-продуцентов аспартазы и аспартат-бета-декарбоксилазы [6].

Настоящая работа имела целью выделение эффективных методов хранения, длительной консервации и репродукции, обеспечивающих высокую жизнеспособность и специфическую ферментативную активность клеток-продуцентов аспартазы и аспартат-бета-декарбоксилазы.

Материал и методика. Объектами исследований явились активные продуценты аспартазы - *Ermitia glauca* шт. ИИМИА В-785 и термофильный штамм *Bacillus subtilis* стр. шт. ИИМИА В-4011, а также аспартат-бета-декарбоксилазы - *Acidigenes faecalis* шт. ИИМИА В-5232 и *Pseudomonas* стр. шт. ИИМИА В-1455

Культуры мезофильных организмов поддерживались на мясопептонном (МП) и рыбном (РП) агарах при 26-30°, а термофильный штамм - при 56°. Для индукции аспартазы в среду добавляли 0,5% фумаровой кислоты, а аспартат-бета-декарбоксилазы - аналогичное количество L-аспарагиновой кислоты.

Аспартазную активность (аспартат-аминок-лиаза, КФ 4.3.1.1) определяли согласно известному методу [10], аспартат-бета-декарбоксилазную активность (L-аспартат-4-карбоксилаза, КФ 4.1.1.12) - по способу [9].

Сохранение жизнеспособности продуцентов и их ферментативной активности изучали в условиях хранения в виде комочков, залитых вязеляноым мясом, с последующим их хранением при +8+10°. Для хранения культур-продуцентов использовали также 30 и 60%-ный глицерин. Помещенная в стерильные притирочные флаконы сырая биомасса культур заливалась по 8-10 мл 30 и 60%-ным раствором глицерина (на 2/3 объема). Флаконы хранились в холодильнике при -10°.

В работе применяли хранение штаммов в почве, замороженной 0,1 мл бактериальной суспензии клеток с определенным титром. После инкубации в течение 1-2 суток при 30° они хранились при сухой комнатной температуре.

Для консервации клеток в жидком азоте использовали биомассу 48-часовых культур, суспендированных в *Mist deessans* (бычья пиворотка-60 мл, МПБ-20 мл и глюкоза-15 мл 40%-ного раствора). В стерильные молибденовые шпигулы вносили по 0,15 мл суспензии с определенным титром. Быстро загляженные шпигулы после постепенного их охлаждения (с режимом 1-2° в течение 1 мин) погружали в жидкий азот, где обесцвечивались температуре -196°. Репродукцию культур из жидкого азота проводили погружением шпигула в водяную баню при 37°.

Применялась консервация в лиофильно высушенном состоянии, и в качестве защитной среды использовали среду *Mist deessans*. Чистоту культур до консервации контролировали методикой посева на агаритованной питательной среде для выращивания продуцентов аспартазы и аспартат-бета-декарбоксилазы, разработанной нами [6], а также прямым микроскопированием с использованием фазового контраста.

Репродукцию жизнеспособности и реактивацию ферментативной активности осуществляли с использованием физиологического раствора и соответствующих реакционных сред. Срок наблюдений - 3 года.

Результаты и обсуждения. Проведенные ранее исследования показали, что изученные штаммы бактерий-продуцентов аспартазы и аспартат-бета-декарбоксилазы в процессе хранения и пересевов в значительной степени теряют исходную активность. Данные, обобщенные в табл., показывают, что хранение клеток-продуцентов в виде комок, залитых вазелиновым маслом, допустимо для *E. aroides* до 2 лет без значительной потери исходной активности. Сравнительно высокая активность отмечается у клеток *B. subtilis* ssp. и *A. faecalis* - от 78 до 71% от исходной при незначительной потере жизнеспособности до 3 лет. Штамм *Pseudomonas* sp. под вазелиновым маслом сохраняет неплохую жизнеспособность и активность в течение 3 лет.

Максимальный срок хранения клеток *E. aroides* и *Pseudomonas* sp. в растворе глицерина - 2 года. Через 2 года хранения как в 30% - ном, так и в 60%-ном глицерине не удалось обнаружить жизнеспособные клетки. Высокая активность (72%) обнаружена у клеток *E. aroides* при хранении в 60%-ном глицерине в течение 1 года.

Для клеток *Pseudomonas* отмечается потеря активности до 26% при хранении в 30%-ном и до 14% в 60%-ном глицерине. Установлены сохранение высокой жизнеспособности клеток *B. subtilis* в глицерине до 3 лет и значительное повышение активности (30-35%) спустя 1 год хранения в 30 - и 60%-ном глицерине.

Максимальный срок сохранения жизнеспособности для клеток *E. aroides* и *Pseudomonas* в почве составляет полтора года с потерей исходной активности соответственно на 1/4 и 2/3. При указанном методе консервации отмечается сохранение высокой жизнеспособности - 80% и ферментативной активности - 85% клеток *B. subtilis* до 3 лет хранения. У клеток *A. faecalis* установлена быстрая потеря жизнеспособности до 14-18% к трем годам хранения при сравнительно высокой и стабильной активности - 78% от исходной. Хранение клеток *A. faecalis* в лиофильно высушенном состоянии в течение года обеспечивает удовлетворительные показатели жизнеспособности и ферментативной активности. Максимальная жизнеспособность сохраняется у клеток *B. subtilis* в течение 3 лет хранения при активности 90% от исходной. Клетки *A. faecalis* и *Pseudomonas* сохраняли удовлетворительную жизнеспособность, но со значительной потерей исходной активности.

Таблица. Сохранение жизнеспособности и ферментативной активности при консервации продуцентов аспартазы (аспя) и аспарта-бета-декарбоксилазы (аспда).

Штаммы бактерий	Условия хранения и консервации	Жизнеспособность спустя годы		Ферментативная активность % от исход. спустя годы	
		1	3	1	3
<i>E. aroides</i> шт. ИНМИА 785	Периодические пересевы МПА +5+8°	++++	++++	100	80
	РПС*, под вазелиновым маслом	+++	-	47	-
	<i>Mist dessicans</i> жидкий азот, -196°	+++	+++	40	39
	<i>Mist dessicans</i> , лиофильная сушка +18+20°	+++	-	45	-
	Почва +18+20°	++	-	75	-
	Глицерин 30-60%-ный, -10-15°	+/+++	-/-	58/72	-/-
<i>A. faecalis</i> шт. ИНМИА	Периодические пересевы, +5+8°	++++	++++	100	80
	РПС, под вазелиновым маслом	+++	+	75	71
	<i>Mist dessicans</i> , жидкий азот, -196°	+++	+++	164	139
	<i>Mist dessicans</i> , лиофильная сушка +18+20°	++	++	35	29
	Почва +18+20°	-+	-	131	78
	Глицерин 30-60%-ный, -10-15°	+++ / +++	+++ / +++	32/35	31/29
<i>Pseudomonas</i> sp шт. ИНМИА 1455	Периодические пересевы, +5+8°	++++	++++	100	80
	РПС, под вазелиновым маслом	+++	++	53	55
	<i>Mist dessicans</i> , жидкий азот, -196°	+++	+++	52	55
	<i>Mist dessicans</i> , лиофильная сушка +18+20°	++	++	38	32
	Почва +18+20°	+	-	42	-
	Глицерин 30-60%-ный, -10-15°	+++ / +++	-/-	26/14	+
<i>B. subtilis</i> ssp шт. ИНМИА 4011	Периодические пересевы, +5+8°	++++	++++	100	80
	РПС, под вазелиновым маслом	++++	+++	80	78
	<i>Mist dessicans</i> , жидкий азот, -196°	+++	+++	183	163
	<i>Mist dessicans</i> , лиофильная сушка +18+20°	+++	+++	93	75
	Почва +18+20°	+++	+++	114	85
	Глицерин 30-60%-ный, -10-15°	+++ / +++	+++ / +++	30/35	68/68

*РПС-специальная среда для хранения и реактивации продуцентов [6].

По нашим наблюдениям, хранение клеток-продуцентов в виде косячков, залитых вазелиновым маслом, допустимо для *E. aroides* до 2 лет без значительной потери активности. Относительно высокую активность отмечали у клеток *B. subtilis* и *A. faecalis*-78 и 71% от

исходной - при незначительной потере жизнеспособности до 3 лет хранения под вазелиновым маслом.

Универсальным методом длительной консервации является хранение в жидком азоте. Клетки испытанных культур-продуцентов, представленных видами *E. aroides*, *A. faecalis* и *Pseudomonas*, сохраняли 70%, а *B. subtilis* - 90% жизнеспособности в течение 3 лет хранения. Однако сохранение высокой жизнеспособности клеток *E. aroides* и *Pseudomonas* не коррелировало с поддержанием высокой ферментативной активности: у клеток *E. aroides* она составляла 38%, у *Pseudomonas* - 55% от исходной активности.

При хранении культур *B. subtilis* и *A. faecalis* в жидком азоте в течение 3 лет наблюдали повышение активности на 83 и 39% соответственно.

Результаты проведенных исследований дают основание рекомендовать для практической реализации метод хранения культур *B. subtilis* ssp и *A. faecalis* в жидком азоте, который обеспечивает высокую жизнеспособность и значительное повышение исходной ферментативной активности до 3 лет хранения. Хранение указанных культур под вазелиновым маслом до 2 лет может быть рекомендовано как сравнительно легкий метод консервации, обеспечивающий хорошие показатели жизнеспособности и активности.

Для поддержания высокой ферментативной активности *E. aroides* может быть рекомендовано хранение в почве и 60%-ном глицерине до 2 лет.

Для бактерий *Pseudomonas* отмечали понижение исходной ферментативной активности при всех использованных методах хранения. Наиболее приемлемым методом длительного сохранения ферментативной активности является консервация клеток в жидком азоте.

Данная работа частично финансировалась грантами МНФ (Сороша) RY1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3512

ЛИТЕРАТУРА

1. Абелян В.А., Антонян А.П., Багдасарян С.Н., Хачатурян А.А., Африкян Э.Г. Авт. свид. N1441785 1.8.1988.
2. Абелян В.А., Багдасарян С.Н. Авт. свид. N1529727 15.8.1989.
3. Абелян В.А., Багдасарян С.Н., Африкян Э.Г. Биохимия, 56, 1288-1295, 1991.
4. Абелян В.А., Меликсетян В.С., Африкян Э.Г. Авт. свид. N1324294 8.9.1987.
5. Авакян З.И., Багдасарян С.Н. Биолог. журн. Армении, 31, 995-997, 1978.
6. Багдасарян С.Н., Абелян В.А. Авт. свид. N1515594 15.6.1989.

- 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.

Գնանախնձորի 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].