

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՍՈՐՈՒՐ ՖՈԱԴԻ ՇԱՐԻՖԻ ԱԼԳԱԲՓՈՒՐ

ԻՐԱՆԻ ԵՐԿՐԱԶԵՐՄԱՅԻՆ ԱՂԲՅՈՒՐԻՑ ԵՎ ԱՆԱՊԱՏԱՅԻՆ
ՀՈՂԻՑ ՄԵԿՈՒՍՑԱՎԱԾ ԶԵՐՄԱՍԵՐ ԲԱՑԻԼՆԵՐԸ՝ ՈՐՊԵՍ
ԶԵՐՄԱԿԱՅՈՒՆ ԵՎ ԹԹՎԱԿԱՅՈՒՆ α -ԱՄԻԼԱԶՆԵՐԻ
ԱՐՏԱԴՐԻՉՆԵՐ

Գ.00.14 – «Կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական
աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2014

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

СОРУР ФОАД ШАРИФИ АЛГАБПУР

ТЕРМОФИЛЬНЫЕ БАЦИЛЛЫ, ИЗОЛИРОВАННЫЕ ИЗ
ИРАНСКОГО ГЕОТЕРМАЛЬНОГО ИСТОЧНИКА И
ПУСТЫННОЙ ПОЧВЫ, КАК ПРОДУЦЕНТЫ
ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ И КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫХ α -АМИЛАЗ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности

03.00.14 – «Биотехнология»

ЕРЕВАН - 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ԵՊՀ կենսաբանության
ֆակուլտետում:

Գիտական ղեկավար՝ կ.գ.դ., պրոֆեսոր Յու.Գ. Պոպով

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ, կ.գ.դ.,
պրոֆեսոր Ժ.Բ. Հակոբյան
կ.գ.թ. Ն.Ա. Հովհաննիսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Հ.Խ.Բունիաթյանի անվան
կենսաքիմիայի ինստիտուտ

Պաշտպանությունը կայանալու է 2014 թ. նոյեմբերի 7-ին, ժամը 15:00 -ին ՀՀ ԳԱԱ
«Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ԲՈՀ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018
մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան փողոց, 14, հեռ/ֆաքս (374 10) 65 41 80:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա»
ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Սեղմագիրը առաքված է 2014 թ. հոկտեմբերի 7-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կ.գ.թ.

Գ.Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена на биологическом факультете ЕГУ.

Научный руководитель:

д.б.н., профессор Ю.Г. Попов

Официальные оппоненты:

член-корр. НАН РА, д.б.н.,
профессор Ж.И. Акопян

к.б.н. Н.А. Оганесян

Ведущая организация:

Институт биохимии имени Г.Х. Бунятына НАН РА

Защита диссертации состоится 7-ого ноября 2014г. в 15:00 на заседании
специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПЦ
“Армбиотехнология” НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна, 14, тел/факс (374 10) 65 41 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПЦ “Армбиотехнология” НАН
РА

Автореферат разослан 7-ого октября 2014г.

Ученый секретарь специализированного совета, к.б.н.

Г.Е. Аветисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В зависимости от оптимальной температуры роста бактерии классифицируются в три следующие группы: психрофилы (5-20°C), мезофилы (15-45°C) и термофилы (45-80°C) [Li et al., 2005]. Термофильные организмы в свою очередь подразделяются на три группы в соответствии с их минимальной и максимальной температурой роста: умеренные термофилы (35-70°C), экстремальные термофилы (55-85 °C) и гипертермофилы (75-113 °C) [Baker et al., 2001]. Термофильные организмы имеют термостабильные клеточные компоненты такие как ферменты, белки и нуклеиновые кислоты. Они также известны своей способностью выдерживать денатурирующее воздействие экстремально кислых и щелочных условий.

Ряд термофилов было изолировано из различных геотермофильных сред, таких как наземные горячие источники и подводные гидротермы, сульфатары, вулканические области [Kristjansson, 1992; Gerday, Glansdorff, 2007; Cary et al., 2010]. Горячие источники являются видом экстремальных сред, широко распространенных по всему миру и представляющих интерес как места для поиска новых термофильных микробов [Charlier, Droogmans, 2007]. Кроме геотермофильных источников другие горячие места обитания – это почвы, нагреваемые солнцем и пустыни [Köberl et al., 2011]. Хотя условия в пустынях очень сильно варьируют в различных регионах мира, все они характеризуются комбинацией экстремальных температур и сухостью, высокой засоленностью почвы, низкими уровнями питательных веществ, высокими уровнями УФ облучения в летнее время и физической нестабильностью, вызываемой сильными ветрами. Ряд исследований, основанных на методах культивации и молекулярных методах, выявили уникальное и чрезвычайное разнообразие микробов в почвах пустынь [Pointing et al., 2009; Angel et al., 2010; Rios de Los et al., 2010].

Bacillus и родственные роды содержат ряд термофильных эндоспорообразующих бактерий [Rainey et al., 1994; Nazina et al., 2001; Romano et al., 2005]. Недавно молекулярно-филогенетические исследования, основанные на 16S рДНК и культурально-зависимых методах, были использованы для изучения микробного разнообразия различных горячих источников [Demirjian et al., 2001]. Члены рода *Bacillus* и родственных родов по всей вероятности являются наиболее часто выделяемые термофильные аэробы из наземных и морских горячих местообитаний и пустынь [Kristjansson, 1992; Gerday, Glansdorff, 2007]. Метаболические особенности термофильных бацилл позволяют предположить, что они могут иметь широкое применение в производственных и природоохранных биотехнологиях [Feitkenhauer et al., 2001; 2003; Rao and Satyanarayana, 2004; Pavlostathis et al., 2006].

Ферменты, продуцируемые термофильными и гипертермофильными организмами, известные как термозимы, также являются термофильными и термоустойчивыми. Они устойчивы к необратимой инактивации при высоких температурах и оптимально активны при высоких температурах, между 60°C и 125°C [Vieil le et al., 1996]. Термостабильные ферменты привлекли внимание благодаря своему потенциальному коммерческому значению в силу присущей им всеобъемлющей стабильности, большой реакционной способности при высоких температурах, низкой вязкости и слабому риску загрязнения в производстве [Antranikian, Egorova et al., 2007]. Термостабильные ферменты изучаются как наиболее удобная альтернатива мезофильным ферментам в некоторых производственных процессах, потому что они высоко специфичны [Giver et al. 1998; Kumar, 2002]. Такие ферменты, полностью завершающие реакции в пищевой и бумажной промышленности, при удалении детергентов, лекарственных веществ, токсических отходов и бурении нефти,

интенсивно изучаются [Haki, Rakshit, 2003; DeFlaun et al., 2007]. Расщепляющие полимеры термозимы, такие как амилазы, пуллулазы, ксиланазы, протеазы и целлюлазы, играют решающую роль в пищевой, химической и фармацевтической промышленности, в производстве бумаги, древесной массы и обрабатывающей отходы отрасли [Schiraldi, De Rosa, 2002].

α -Амилазы (ЕС3.2.1, 1,4- α -D-глюканогидролаза и эндоамилаза) являются внеклеточными эндоферментами, которые неупорядоченно расщепляют 1, 4- α -D-глюкозидные связи между соседними глюкозными единицами в линейной цепи амилазы [Gupta et al., 2003]. Разжижение крахмала при высоких температурах с использованием термоустойчивых амилаз имеет определенное преимущество перед другими путями разжижения крахмала. Было установлено, что представители *Bacillus* и родственных родов являются наилучшими кандидатами для коммерческого производства термоустойчивых α -амилаз [Dheeran et al., 2010; Finore et al., 2011]. Большое число микробных α -амилаз применяются в пищевой, текстильной, бумажной промышленности и в производстве детергентов и во многих других областях, таких как клиническая, медицинская и аналитическая химия [Das et al., 2011]. Термоустойчивость, устойчивость к кислотной pH и длительная сохранность являются предпочтительными характерными чертами амилаз из бацилл, потенциально пригодными в крахмальном производстве [Bertoldo, Antranikian, 2001; Gupta et al., 2003; Shivaramakrishnan et al., 2006].

Производство α -амилаз традиционно осуществлялось с использованием глубоинной ферментации (ГФ) из-за простоты обращения и легкости контроля температуры и pH, но и система твердофазной ферментации (ТФ) представляется многообещающей альтернативной технологией [Pandey et al., 2001; Anto et al., 2006; Ibrahim et al., 2012]. ТФ имеет преимущество перед ГФ благодаря технической простоте, меньшему капиталовложению, низким уровнем катаболической репрессии и ингибирования конечным продуктом, меньшему объему затрачиваемой воды, лучшей регенерации продукта и высокому качеству продукции [Pandey et al., 2001; Ibrahim et al., 2012]. Ферментация протекает в отсутствие или почти в отсутствие свободной воды. Многие вещества используются в качестве субстратов ТФ; однако пшеничные отруби являются ключевыми и наиболее обычными при использовании в различных процессах. Применение этих сельскохозяйственных отходов в биопроцессах решает также проблемы поллюции, что в противном случае может привести к возникновению задачи по ее удалению.

До настоящего времени существует необходимость в выделении и описании новых термофильных бацилл, способных продуцировать высокостабильные амилазы в экстремальных условиях. Наше исследование и его конечные цели вносят скромный вклад в развитие данной области как с научной точки зрения, так и для решения практических задач. В данном исследовании приводятся данные по очистке и биохимической характеристике разлагающих крахмал термостабильных α -амилаз из бацилл, выделенных в Иране, в пустыне Лут и из горячего источника Джовшан.

Цели и задачи исследования. Целью исследования было выделение расщепляющих крахмал термоустойчивых и кислотоустойчивых α -амилаз, продуцируемых термофильными бациллами из иранского горячего источника и геотермальной почвы, их очистка и биохимическая характеристика, а также образование и активность α -амилаз при твердофазной и глубоинной ферментации.

Для достижения заданной цели были поставлены следующие задачи:

- Выделение термофильных бацилл, продуцирующих термоустойчивую и кислотоустойчивую α -амилазу, из осадочных образцов горячего источника Джовшан на горе Ситч и геотермальной почвы Гандом Берян пустыни Лут Ирана.

- Идентификация выделенных бактерий по фенотипическим и филогенетическим признакам (на основе анализа последовательности генов 16S р РНК).
- Изучение образования выделенными бактериями термоустойчивой α -амилазы при ТФ и ГФ с использованием в качестве субстрата отходов производства пшеничных отрубей.
- Изучение влияния времени инкубации, размера инокулюма, температуры и рН инкубации, дополнительных источников углерода и азота на выход α -амилазы.
- Очистка α -амилазы при осаждении изопропанолом, ионообменной хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе ДЕ-52 и гельфильтрацией на сефадексе G-100.
- Определение молекулярного веса очищенной расщепляющей крахмал α -амилазы и термо- и рН устойчивости.

Научная новизна. Впервые были выделены и идентифицированы на основе анализа последовательностей генов 16S рРНК и депонированы в GenBank новые термофильные штаммы бактерий из горячего источника Джовшан и геотермальной почвы пустыни Лут Ирана. Впервые термофильные бактерии, продуценты термоустойчивой и кислотоустойчивой α -амилазы, были использованы для изучения активности разрушения крахмала при твердофазной и глубоинной ферментации. Для всех изученных штаммов продуцирование и активность α -амилаз были выше при ТФ, чем при ГФ. Термоустойчивые и кислотоустойчивые α -амилазы были очищены и их молекулярные веса определены. Были определены влияние температуры и рН, источников углерода и азота на образование и активность α -амилаз, установлены также температурная и рН стабильности.

Практическая ценность работы. Полученные результаты показывают, что горячий источник Джовшан и геотермальная почва пустыни Лут в Иране могут служить источниками для выделения новых термофильных бактерий, имеющих биотехнологическое применение. Выделено четыре штамма термофильных бактерий, продуцирующих α -амилазы, и идентифицированных как виды рода *Bacillus*. Поскольку α -амилазы выделенных штаммов имеют умеренную кислото- и термостабильность и могут культивироваться на дешевых субстратах, следовательно они могут быть подходящими кандидатурами для использования в крахмальном, биотопливном производстве и производстве детергентов. Изоляты могут успешно использоваться для получения α -амилазы, потребляя пшеничные отруби в соотношении 1:1 за относительно короткое время.

Основные положения выносимые на защиту. Результаты исследования посвящены:

- Продуцирующие α -амилазы штаммы термофильных бактерий, выделенных из горячего источника Джовшан (2 изолята) и почвы из Гандом Берян в пустыне Лут (2 изолята), на основании фенотипических и филогенетических подходов были идентифицированы как виды рода *Bacillus*.
- Продуктивность α -амилаз бактериальными изолятами при использовании в качестве субстрата пшеничных отрубей была выше при ТФ, чем ГФ.
- Из испытанных углеводов добавление глюкозы (0.05 г/г сухого субстрата) и растворимого крахмала увеличило производство α -амилазы, тогда как добавление различных источников азота (0.02 г/г) вызвало уменьшение в образовании фермента при ТФ.
- Молекулярные веса очищенных α -амилаз, определенные с помощью ДСН-ПААГ электрофореза, составили около 28-70 кДа и были устойчивыми в широких пределах температур и рН, между 30-110°C и 3-9, соответственно.

Апробация работы. Материалы этой работы были доложены и обсуждены на кафедре микробиологии, биотехнологии микробов и растений Ереванского государственного университета; факультета сельскохозяйственной биотехнологии

университета Шагид Багонар в Кормане (Иран) и факультете молекулярной биологии университета Эман Хоссейн в Тегеране (Иран); Пушкинской международной школе-конференции молодых ученых “Биологическая наука XXI века”, апрель 16-21, 2012, Пушкино, Россия; международной конференции молодых ученых “Новые аспекты в молекулярной биотехнологии и биохимии”, июнь 27-28, 2013, Ереван, Армения.

Публикации. Шесть публикаций, включающих четыре статьи и два тезиса, основанные на экспериментальных данных были опубликованы в различных журналах и записках.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения и списка литературы; содержит 103 страницы, 15 таблиц и 38 рисунков. Приложение содержит детальную информацию и экспериментальные данные, касающиеся обсуждаемой темы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В литературном обзоре представлен анализ доступной информации по биоразнообразию и биологическим свойствам термофильных микробов, включая бациллы, выделенных из геотермальных источников и пустынь, возможным механизмам термоустойчивости, биотехнологическому применению продуцируемых термофилами термоустойчивых ферментов, свойствам термозимов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Объектами изучения были образцы осадка из горячего источника Джовшан на горе Сирг и геотермальной почвы, взятой из Гандом Беряна в пустыне Луг Ирана. Почва и смежные осадочные образцы были собраны в стерильные стеклянные колбы и сохранялись при 4°C до их использования в лаборатории. Из образцов осадка и почв были выделены продуцирующие α -амилазы черыре штамма термофильных бацилл, которые и послужили основными объектами исследования.

Получение накопительных культур и изолирование культур. Образцы инкубировались в среде, содержащей следующие вещества на литр: хлористый натрий, 5г; кархмал, 20г; дрожжевой экстракт, 5г; пептон, 10г; CaCO₃, 6г; агар-агар, 20г; pH 7.2. По одному грамму каждого осадочного или почвенного образца были суспендированы в 9 мл стерильной дистиллированной воды, и путем серийных разведений были приготовлены концентрации 10⁻¹-10⁻⁶; по 1 мл каждого разведения было растерто на среде; инкубация проводилась при 56°C в течение 24 часов. Перед инкубацией все образцы обрабатывались в течение 10 мин при 80°C для выделения только эндоспорообразующих микроорганизмов. Чистые культуры получались путем рассева накопительной культуры на питательный агар с последующими пересевами [Смайберт, Криг, 1984].

Фенотипические признаки. Фенотипические признаки изолятов были изучены стандартными методами, описанными в [Смайберт, Криг, 1984]. Морфологические признаки штаммов были исследованы под световым микроскопом Nikon и электронным микроскопом TEM Zeiss EM10. Характеристика каждого бактериального изолята выполнялась по окраске колонии, размеру, профилю, краю и окраске по Граму. Для определения особенности штаммов роста при различных температурах (10-70°C) и значениях pH (3-10) и различных концентрациях NaCl (0-22%) была использована та же вышеупомянутая жидкая среда. Рост оценивался путем измерения оптической плотности (ОП) клеточной суспензии при 600 нм на

спектрофотометре (модель 722G UV-Visible). Гидролитическая активность определялась с использованием в качестве субстрата молока, твин-80 и растворимого крахмала. Каталазная, уреазная, оксидазная и реакция Фогес-Проскауэра определялись стандартными методами, описанными в [Смайберт, Криг, 1984]. Устойчивость штаммов к антибиотикам определялась с использованием коммерческих дисков.

Филогенетический анализ. Тотальную ДНК из чистой культуры получали методом СТАВ/NaCl. Фрагменты гена 16S рРНК были ПЦР- амплифицированы, применяя бактериальные специфические праймеры P1B16F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и M1B16R (5'-GGCTGCTGGCACGTAGTTAG-3'). Условия ПЦР анализа были: начальная денатурация при 94°C в течение 2 мин; затем 35 циклов денатурации при 95°C в течение 1 мин, отжиг при 55°C в течение одной минуты; затем конечное удлинение цепи при 72°C в течение десяти минут. Идентичность изолятов определялась BLAST анализом. Нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР были посланы в иранскую SinaGene компанию для определения последовательности ДНК (www.cinnaGen.com). Филогенетический анализ проводился с использованием версии MEGA5 компьютерного пакета и данных GeneBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Филогенетическое древо было сконструировано методом neighbour-joining, используя дистанционный матрикс выравнивая [Hall, 2004]. Последовательности гена 16S рРНК, приведенные в данном исследовании, были депонированы в базе данных GenBank'a.

ТФ. Клетки собирались на поздней экспоненциальной фазе и культуральный бульон использовался в качестве инокулюма (10% инокулюма (объем на единицу массы)) и инкубировался при 50°C в течение 24 ч. Образование фермента контролировалось каждые 24 ч. В течение 4 дней. Фермент экстрагировался в 50 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7) на круговой качалке при 200 об/мин. В течение 30 мин. Содержимое фильтровалось через муслиновую ткань. Фильтрат центрифугировался при 8000 xg при 4°C в течение 10 мин, супернатант тщательно собирался и использовался в качестве грубого экстракта фермента для его определения. α -Амилазная активность определялась спектрофотометрическим методом в испытуемой смеси, состоящей из 0,5 мл грубого экстракта фермента, 2,5 мл 1% растворимого крахмала. Одна единица (U) α -амилазной активности определялась как количество фермента, которое высвобождает восстановленный сахар в форме глюкозы за минуту, в условиях анализа и выражается в U/г сухого субстрата.

ГФ. Инокулюмы собирались путем добавления стерильной дистиллированной воды на свежeverащенные на питательном агаре косяки, из которых по 1 мл клеточной суспензии инокулировалось в 100 мл стерильной ферментационной среды и инкубировалось в течение ночи при 50°C. Был изучен эффект различных размеров инокулюма (объем на массу 10, 20, 30 и 40%). Отношение субстрат/влажность сохранялось 1:1.5, 1:2, 1:2.5 и 1:3, образование фермента проверялось с использованием пшеничных отрубей в качестве субстрата и среды с минеральными солями в качестве увлажняющего агента. Для изучения эффективности различных индукторов в среду ГФ по отдельности добавлялись различные источники углерода (0,05 г/г сухого вещества), такие как глюкоза, мальтоза, сахароза, растворимый крахмал, и источники азота (0,02 г/г сухого вещества), такие как казеин, дрожжевой экстракт, NH₄Cl и мочевины. Для изучения эффекта температуры на активность фермента были поставлены пробы при 35, 45, 55, 65, 75 и 85°C. При определении

подходящей амплитуды рН буферы для проб фермента варьировали 5.5 (ацетатный буфер), 7 и 9 (фосфатный буфер).

Анализ фермента. α -Амилазная активность определялась методом динитросалициловой кислоты [Miller, 1959]. Одна единица амилазной активности соответствовала количеству фермента, которое высвобождало 1.0 μ М глюкозы в минуту в условиях анализа. Во всех пробах активность фермента измерялась как среднее из трех автономных наборов определений и во всех тех случаях, когда стандартное отклонение считалось значимым. Содержание общего белка оценивалось по методу Бредфорда, с использованием в качестве стандарта альбумина бычьей сыворотки [Bradford, 1976].

Очистка фермента. Фермент очищался осаждением изопропанолом, ионообменной хроматографией на ДЕАЕ целлюлозе ДУ-52 и гельфильтрацией на сефадексе G-100.

Определение молекулярной массы фермента. Определение молекулярного веса проводилось путем натрий додецил сульфат-полиакриламид гель электрофорезом (SDS-PAGE), используя 10% полиакриламидный гель по методу Лоеммли [Laemmli, 1970].

Влияние рН и температуры на α -амилазную активность. Для обнаружения максимальной активности α -амилазы продуценты инкубировались в течение 30 мин в температурном диапазоне 30-110°C. Влияние рН определялось при 90°C в диапазоне рН 3,0-9,0 с соответствующими буферами. Все эксперименты выполнялись в трех повторностях и приводилась стандартная ошибка.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Выделение и идентификация продуцирующих α -амилазу термофильных бактерий из горячего источника Джовшан и геотермальной почвы пустыни Лут в Иране

Из почвенных образцов области Гандом-Берян пустыни Лут в Иране были выделены и охарактеризованы два изолята аэробных, образующих эндоспores грамположительных палочковидных бактерий, обозначенные как Иранский S1 и Иранский S2 соответственно. Гандом-Берян (означающая «выжженная пшеница» по-персидски) представляет собою большое плато в 480 км², покрытое вулканической лавой, что делает экстремальной атмосферу в этом районе (Рис.1). Температура может часто достигать даже 71°C, а рН почвы – 6.2.



Рис.1. Местоположение горячего Беряна Источника Джовшан



Рис.2. Расположение Гандом-Беряна в пустыне Лут

Два штамма аэробных, образующих эндоспores грамположительных палочковидных бактерий, обозначенные как Иранский B1 и Иранский B2 соответственно, были изолированы и в дальнейшем охарактеризованы как образцы осадка горячего источника Джовшан (Керман, Иран). Горячий источник Джовшан расположен

примерно в 70 км от юго-восточной части Кермана, в центре Ирана, на восточной стороне горы Сирх (рис.2). Джовшанская геотермальная система охватывает 6 термальных источников с температурой на выходе от 39.3 до 46.6°С. Значения pH этих источников колеблются от слегка кислой до нейтральной (6.8-7), а электропроводность около 1500 $\mu\text{S}/\text{Cm}$.

Колонии изолята Иранский S1 плоские, очень маленькие, прозрачные и бесцветные. Колонии изолята Иранский S2 плоские, с зубчатыми краями, иррегулярной формы и беловатые. Колонии изолята Иранский B1 компактные, мелкие и желтоватые, а изолята Иранский B2 – расплывающиеся, плоские нерегулярной формы и беловатые. Электронномикроскопическое изучение штаммов обнаружило, что все стадии образования эндоспор и покровов в течение всех стадий были типичными для спорообразующих бактерий. Клетки изолятов Иранский S1 и B2 были укороченными цилиндрическими, тогда как клетки изолятов Иранский S2 и B1 были короткими нитевидными (рис.3). В клетках изученных штаммов эллиптические эндоспоры были расположены центрально (Иранский B1), терминально (Иранский S1) или субтерминально (Иранский S1 и B2) вдоль клеточной оси. Спорангиум не был раздут ни у одного из изученных изолятов.

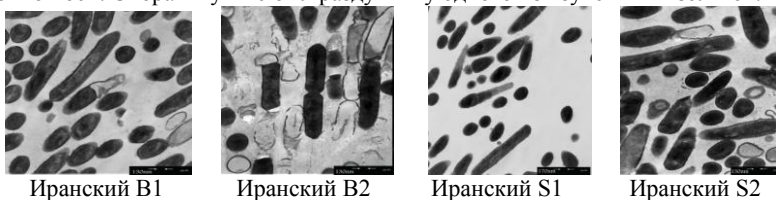


Рис. 3. Электронномикроскопическое изображение всех изученных изолятов (x 21000).

Степень роста изолятов определялась при температурном ряде 10-80° С. Для изолята B1 максимум степени роста был при 60° С, тогда как для изолята S1 максимум степени роста был при 75° С. Изоляты Иранский S2 и B2 имели максимум степени роста при 65° С. Оптимальная температура роста для изолятов была 50° С. Изолят B1 был не способен расти при 65° С или ниже 20° С, изолят S2 был не способен к росту при температуре выше 75° С или ниже 25° С, а изоляты B2 и S1 были не способны к росту при температуре выше 70° С или ниже 20° С (рис. 4).

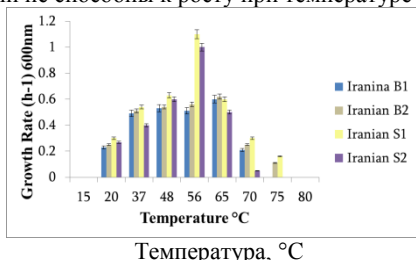


Рис.4. Рост изолятов при различных температурах

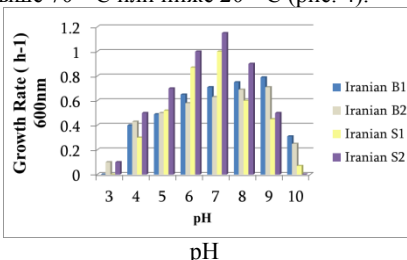


Рис.5. Пределы pH для изолятов

При рассмотрении границ pH для роста бацилл установлено, что все изоляты росли в среде со значениями pH в пределах от 3 до 10. Значение pH, близкое к нейтральному, способствовало оптимальному росту изолятов. Изоляты не росли при

pH ниже 3. Наибольший рост изолятов B1 и S1 наблюдался при pH 9, в то время как у изолятов B2 и S2 наибольший рост был при pH 9,5 (рис. 5).

Изолят B2 рос при концентрации NaCl до 12,5%, а изолят B1 был способен расти при 10% NaCl. Иранский S1 рос при концентрации NaCl до 22%, а Иранский S2 был способен к росту при 20% NaCl (рис.6). Таким образом, наши изоляты росли в температурных и pH пределах, характерных для их местообитания.

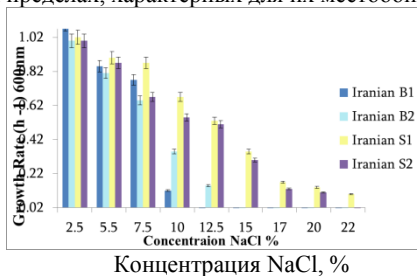
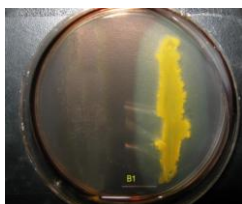
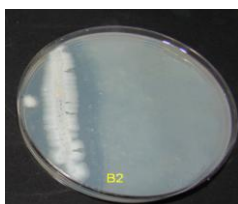


Рис.6. Рост штаммов в присутствии NaCl

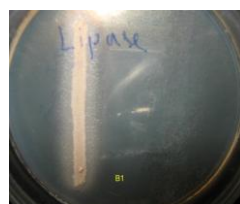
Все изученные изоляты были каталазо- и оксидазоположительными, исключая Иранский S2, показавший положительную реакцию в эксперименте с метиловым красным. Все они были способны утилизировать такие источники углерода как глюкоза, мальтоза, сахароза, галактоза, лактоза и салицин и были неспособны продуцировать индол из триптофана. Изоляты были неспособны утилизировать цитрат, тогда как изолят B2 был уреазоположительный. Результаты биохимических особенностей изолятов представлены в таблице 1. Изоляты дали положительные результаты на гидролиз крахмала, твин-80 и казеин (молоко) (рис. 7).



На амилолитическую активность указывают бесцветные зоны вокруг колоний после обработки



На липолитическую активность указывает появление зон осаждения вокруг колоний



На казеинолитическую активность указывает появление прозрачных зон вокруг колоний

Рис.7. Гидролитические активности изолятов

Был проведен филогенетический анализ изолированных термофильных бацилл, основанный на анализе их 16S рPHK гена. С этой целью гены 16S рPHK из экстрагированной ДНК каждого изолята были успешно амплифицированы с помощью ПЦР и в дальнейшем секвенированы (рис. 8). Поиск гомологии выполнялся с использованием основной BLASTN поисковой программы на NCB1 вебсайте. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рPHK всех изолятов подтвердил их близкую гомологию с членами рода *Bacillus*. Штамм Иранский B1 был идентифицирован как *Bacillus* sp. (99%), штамм Иранский B2 был идентифицирован как штамм Иранский S2 был идентифицирован как *Bacillus* sp.(98%) (табл.2). Последовательности гена 16S рPHK были депонированы в базе

данных ГенБанка под каталожными номерами HQ 702748 (B1), HQ 734816 (B2), HQ 823666 (S1), HQ 823667 (S2).

Таблица 1

Биохимическая характеристика термофильных изолятов

Биохимическая характеристика	Изоляты			
	Иранский S1	Иранский S2	Иранский B1	Иранский B2
Уреаза	-	-	-	+
Тест на метиловый красный	+	-	+	+
Фогес-Проскауэра тест	W	W	W	+
Образование индола	-	-	-	-
Утилизация цитрата	-	-	+	-
Кислота из глюкозы	+	+	+	+
Галактоза	+	+	W	+
Лактоза	+	+	W	W
Мальтоза	+	+	W	W
Сахароза	+	+	+	W
Д-маннитол	+	-	W	+
Д-сорбитол	+	-	W	W
Салицин	+	+	W	W

Обозначения: (+), (-) и w для позитивной, негативной и слабо позитивной реакции

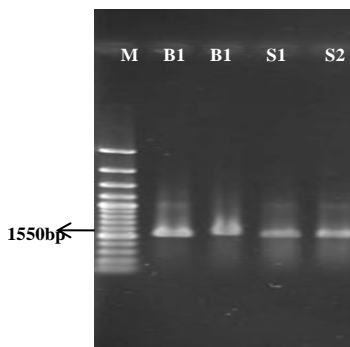


Рис. 8. Электрофорез продуктов ПЦР на 1% агарозном геле
Первый колодец: ДНК маркер размера и следующие источники: амплифицированный 16S рРНК ген бактериальных изолятов.

Филогенетическое древо сконструированное по методу neighbour-joining; оба изолята были частью кластера рода *Bacillus* (рис. 9).

Таблица 2

Ближайшие последовательности и % сходства изученных изолятов

Изоляты	Длина ДНК (по)	Ближайшая последовательность	% сходства	Номер внесения
Иранский B1	526	<i>Bacillus Sp.</i> TGS 437	99	HQ702748
Иранский B2	527	<i>B. licheniformis</i> .B8	99	HQ734816
Иранский S1	527	<i>Bacillus sp.</i> LS04	99	HQ823666
Иранский S2	527	<i>Bacillus sp.</i> DY17	98	HQ823667

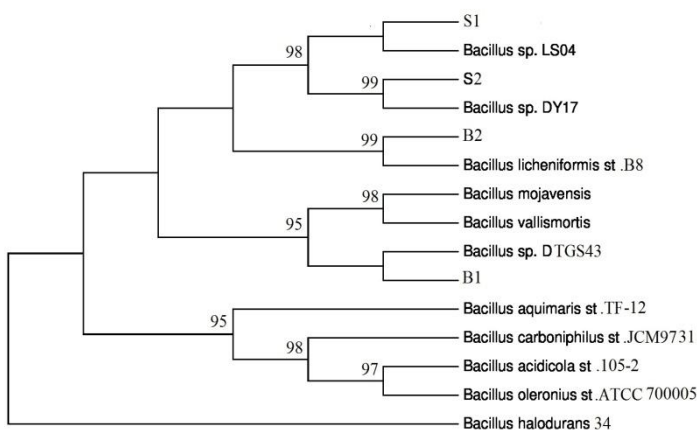


Рис. 9. Филогенетическое древо конструировалось по методу neighbour-joining с использованием distance матрикс выравнивания для изученных изолятов

3.2 Изучение образования термоустойчивой α -амилазы при ТФ выделенными бациллами, использующими в качестве субстрата пшеничные отруби

Было изучено образование α -амилазы бациллярными штаммами при ТФ, использующими образующие пшеничные отруби отходы в качестве субстрата. Результаты настоящего исследования показали, что образование амилазы увеличивается линейно с увеличением времени инкубации до 48 часов, а при дальнейшей инкубации до 120 часов наблюдается уменьшение в образовании амилазы (табл. 3). Максимальное образование амилазы достигается при 48 часах. Максимальное образование фермента получено с начальным содержанием влажности 60% и равнялось 293, 244.1 и 187.15 U/мл для *Bacillus sp.* Иранский S1, *Bacillus licheniformis* Иранский B2 и *Bacillus sp.* Иранский B1 соответственно. Результаты показывают, что дальнейшая инкубация не приводит к какому-либо увеличению активности. Максимальное образование фермента для *Bacillus sp.* Иранский S2 (96 U/г) наблюдалось после 72 часов и уменьшалось при дальнейшей инкубации. α -Амилаза зависела от роста, поскольку кинетика роста клеточной массы точно соответствовала степени образования фермента. Клеточная масса также

увеличивалась вплоть до 72 часов, затем уменьшалась вместе с клеточным ростом; результаты свидетельствуют, что образование фермента имеет прямую связь с клеточным ростом.

Таблица 3

Образование α -амилазы штаммами бацилл на субстрате из пшеничных отрубей при ТФ

Время инкубации (ч)	Активность фермента (U/г)			
	<i>Bacillus</i> sp. Иранский B1	<i>Bacillus licheniformis</i> Иранский B2	<i>Bacillus</i> sp. Иранский S1	<i>Bacillus</i> sp. Иранский S2
24	125.1	198.2	230.9	24
48	187.1	244.1	293	75
72	98.8	200.8	211.1	96
96	81.2	188.5	155.5	50

Было показано, что 10% (объём на массу) инокулома было оптимальным для образования фермента при ТФ (рис. 10). Большие инокуломы уменьшали образование фермента. Это могло быть из-за ограниченности питательных веществ при большем размере инокулома. Таким образом, в последующих исследованиях использовался 10% (объём на массу) инокулом. Другие исследователи сообщали о 20% размере инокулома как оптимального при ТФ на пшеничных отрубях в производстве амилазы [Baysal et al., 2008], хотя Анто с соавторами [Anto et al., 2006] сообщали, что увеличение размера инокулома оказывало неблагоприятное действие на образование фермента.

Влажность является критическим фактором для образования фермента при ТФ. Увеличение размера инокулома, как мы видели, имело неблагоприятное воздействие на образование фермента. В течение ферментации влажность среды меняется в результате испарения и метаболической активности. При ТФ более высокий уровень влажности уменьшает пористость, меняет структуру частиц пшеничных отрубей, увеличивает липкость, уменьшает объём газа и диффузию, что приводит к понижению переноса кислорода. В противоположность этому, низкое содержание влаги ведёт к уменьшению растворимости питательных веществ в твердом субстрате, меньшей степени разрастания и высокому напряжению воды. В наших исследованиях высокое образование фермента наблюдалось, когда отношение субстрат/влага сохранялось на уровне 1:2,5 по сравнению с более низким или более высоким уровнями влажности.

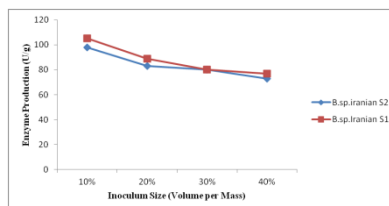
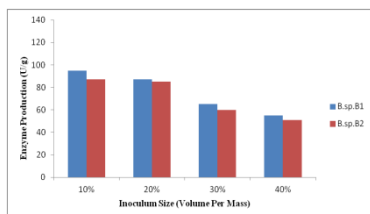


Рис.10. Влияние размера инокулома на образование α -амилазы штаммами бацилл
 α -Амилаза является индуцированным ферментом [Gupta et al., 2003; Ramakrishnan et al., 2006], который обычно индуцируется в присутствии крахмала или продукта его гидролиза – мальтозы. Добавление источников углерода в форме различных

углеродсодержащих соединений (глюкоза, мальтоза, сахароза и растворимый крахмал) в качестве эффекторных молекул приводит к маргинальному увеличению образования α -амилазы. Результаты приведены на рис.11. Глюкоза дает наивысший выход фермента (128 + 5 U/r) для *Bacillus* sp. Иранский S2, следом идет растворимый крахмал (118 U/r), затем мальтоза (110 U/r) и сахароза (100 U/r). Максимальное образование фермента было 235,11 и 163,2 U/r для *Bacillus licheniformis* B2 и *Bacillus* sp. B1 на 1 % w/w крахмала.

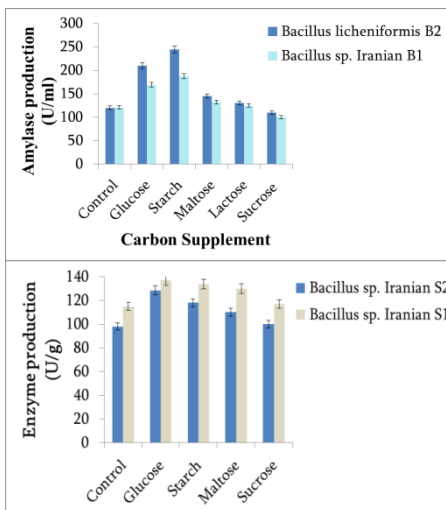


Рис. 11. Амилазная активность штаммов бацилл при ТФ с добавлением различных углеродсодержащих субстратов

В наших исследованиях, как показано на рис. 12 в сравнении с контролем, не было сколько-нибудь значительного увеличения выхода фермента в случае добавления неорганического или органического источника азота. Более того, добавление органического азота, и особенно неорганических источников азота, к среде приводило к выраженному уменьшению образования α -амилазы *Bacillus* sp. Иранский S1 и S2.

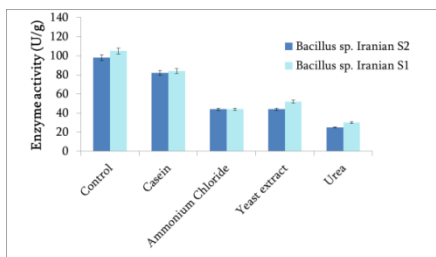


Рис. 12. Амилазная активность штаммов бацилл при ТФ с добавлением различных субстратов азота

На оптимальное образование фермента сильно влияли различные температуры от 35° С до 85 °С. Результаты, приведенные на рис. 13, показывают, что температура культивирования 55°С является наилучшей для ферментативной активности *Bacillus*

sp. Иранский S2. Вдобавок, высокая температура могла уменьшить содержание влаги в ферментационной среде и рост организма приводил к уменьшению содержания фермента. Однако, в наших исследованиях при 80°C 90% активность была сопоставима с оптимальной ферментативной активностью при 55°C.

Среди физико-химических параметров pH ростовой среды играет важную роль, индуцируя морфологические изменения в организме и изменения в секреции фермента. В наших исследованиях оптимальное образование амилазы было при pH 5,5 (рис. 14). Результаты показывают, что образование фермента обычно устойчиво при pH 4,0-7,0, что указывает на превосходное буферное свойство агроосадков, используемых для твердофазной ферментации.

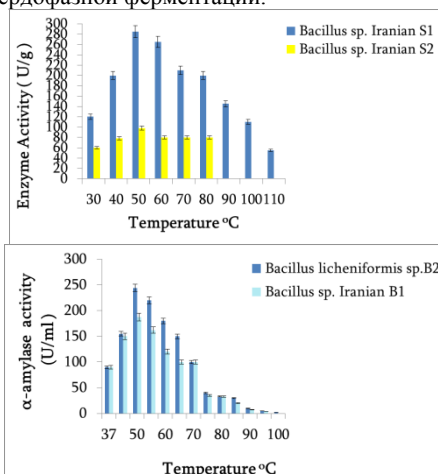


Рис. 13. Образование α-амилазы штаммами бацилл при ТФ при различных температурах

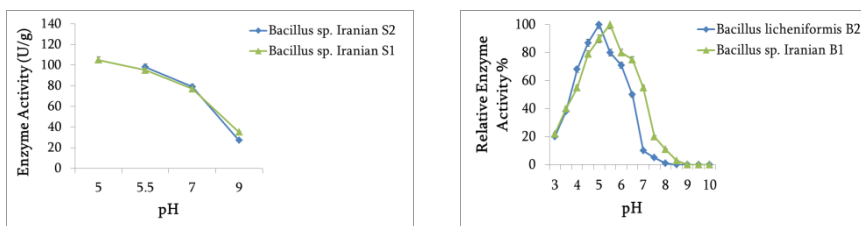


Рис. 14. Образование α-амилазы штаммами бацилл при ТФ при различных значениях pH

3.3. Изучение образования термоустойчивой α-амилазы изолированными бациллами при ГФ с использованием в качестве субстрата пшеничных отрубей

При глубинной ферментации образование α-амилазы достигло максимума в 70 U/г за 72-часовой инкубационный период (рис. 15). Позднее увеличение инкубационного периода не обнаружило какого-либо серьезного увеличения образования фермента, скорее оно уменьшилось.

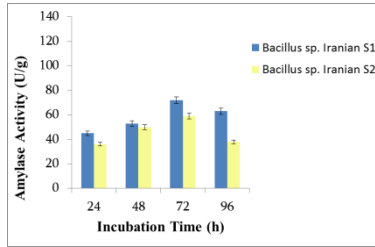


Рис. 15. Образование α -амилазы штаммами бацилл на пшеничных отрубях как субстрате при ГФ

При ГФ для образования амилазы были использованы различные источники углерода; максимальную активность показали глюкоза и крахмал по 60 U/г и 72 U/г за 72 часа; для источников азота максимальное образование получено на казеине – 55 U/г и 59 U/г за 72 часа инкубации для *Bacillus sp.* Иранский S1 и S2 (рис. 16).

Результаты показывают влияние различных температур инкубации на образование амилазы штаммами бацилл: максимальное образование амилазы получено при 55° С (рис. 17). Увеличение температуры культивирования уменьшало образование фермента. Образование фермента сильно ингибировалось при 60° С. Это могло быть из-за того, что при высокой температуре рост бактерий сильно ингибировался, и, отсюда, образование фермента также подавлялось.

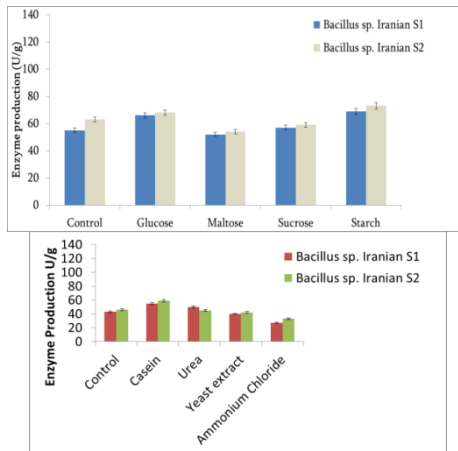


Рис. 16. Амилазная активность штаммов бацилл при ГФ с добавлением различных углеродных и азотных субстратов

В наших исследованиях образование амилазы штаммами бацилл при ГФ было максимальным при 5,5 и 5 (61 U/г, 63 U/г для *Bacillus sp.* Иранский S1 и S2) (табл. 4). Дальнейшее увеличение величины рН приводило к уменьшению активности амилазы. Когда рН менялся ниже или выше оптимума, активность снижалась или наступала денатурация.

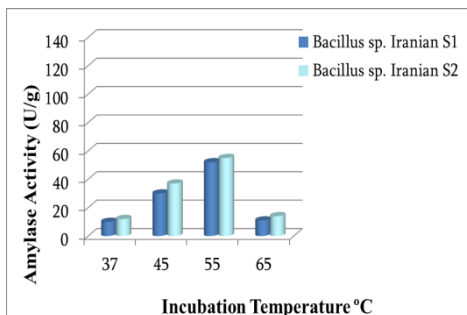


Рис. 17. Образование α -амилазы штаммами бацилл при ГФ при различных температурах

Таблица 4
Влияние варьирования pH среды на образование амилазы при ГФ

pH	Активность амилазы U/г	
	<i>Bacillus</i> sp. Иранский S1	<i>Bacillus</i> sp. Иранский S2
5	59	63
5.5	61	60
6	18	20
6.5	7.5	8
7.5	2	2.5
9	0.5	0.6

Пшеничные отруби, представляют собой недорогой и легко доступный сельскохозяйственный продукт, который может заменить имеющие коммерческую ценность более дорогие вещества в разработке экономичной подходящей ферментационной среды для получения высокого выхода α -амилазы. Однако, настоящее исследование является изучением в лабораторном масштабе и оно в дальнейшем должно быть улучшено для широкомасштабной ТФ. Продуктивная активность α -амилаз из бациллярных изолятов, использующих в качестве субстрата пшеничные отруби, была выше при ТФ, чем при ГФ.

3.4. Очистка α -амилаз и определение молекулярного веса очищенных α -амилаз и их температурной и pH стабильности

Фермент был очищен путем осаждения изопропанолом, ионообменной хроматографией на ДЕАЕ целлюлозе ДЕ-52 и гельфильтрацией на сефадексе G-100. Грубый фермент из образца *Bacillus* sp. Иранский S1, полученный осаждением изопропанолом и последующим диализом, был очищен ионообменной хроматографией на ДЕАЕ целлюлозе ДЕ-52 и гель хроматографией на сефадексе G-100. диализированная фракция имела общую активность 1520 U и специфическую

активность 157.7 U мг⁻¹. Элюированный образец показал главный пик амилазной активности (рис. 18). Эта фракция показала общую активность 696 U и специфическую активность 289.33 U мг⁻¹. Общая очистка увеличилась до 88.41 раз.

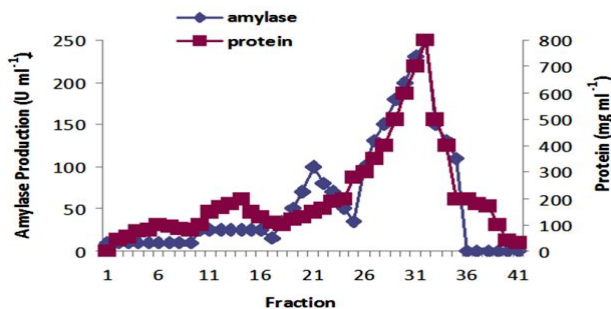


Рис. 18. Профиль элюции α -амилазы *Bacillus* sp. Иранский S1 Из колонки ДЕАЕ целлюлозы

Концентрированные активные фракции были очищены гель хроматографией на сефадексе G-100. Был получен единичный пик амилазной активности (рис. 19). Процедура очистки, выполненная для фермента α -амилаза, привела к очистке в 99 раз с 25% выходом. В данном исследовании фермент полученный к концу процесса очистки имел активность 375.9 U мг⁻¹. Обзор очистки дается в табл. 5.

Молекулярные веса α -амилаз находятся обычно между 50-60 kDa, но в литературе сообщаются молекулярные веса, колеблющиеся от 10 до 210 kDa [Gupta et al., 2003]. Молекулярная масса изученной α -амилазы из *Bacillus* sp. Иранский S1 составляла 70 kDa на 10% SDS-PAGE. Анализ очищенного фермента на SDS-PAGE обнаружил мономер с молекулярной массой в 36, 36 и 28 kDa для *Bacillus* sp. B1, *Bacillus licheniformis* B2 и для *Bacillus* sp. Иранский S2, соответственно (рис. 20).

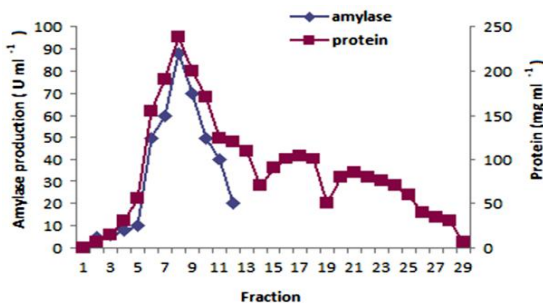


Рис. 19. Профиль элюции α -амилазы *Bacillus* sp. Иранский S1 из колонки сефадекс G-100

Очистка экстрацеллюлярной α -амилазы *Bacillus* sp. Иранский S1

Этапы очистки	Изопропанольный химический осадок	Колонка ДЕАЕ целлюлозы	Колонка сефадекса G-100
Общая активность	1520	696	288
Общий белок (Mg)	9.8	4.2	0.84
Специфическая активность (U мг ⁻¹)	157.77	89.33	375.9
Выход, %	7	55	25
Степень очистки	43.2	88.41	98.9

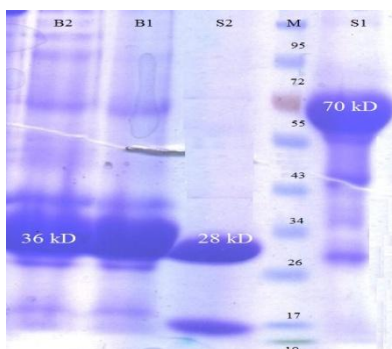


Рис. 20. SDS-PAGE очищенных α -амилаз: М – маркер молекулярного веса; B1 – очищенная α -амилаза из *Bacillus* sp. B1, B2 – очищенная α -амилаза *Bacillus licheniformis* B2, S1 – очищенная α -амилаза из *Bacillus* sp. S1 и S2 – очищенная α -амилаза из *Bacillus* sp. Иранский S2

Оптимальная температура для очищенной α -амилазы была 90° С, с 20 и 40 % относительных активностей при 30 и 110°С, соответственно. Амилаза проявила активность в широких пределах значений pH от 3,0 до 9,0 с оптимумом при pH 5,0, сохраняя 45% начальной активности при pH 3,5 и 20% при pH 8,0. Данные по влиянию pH и температуры на активность α -амилазы приведены на рис. 21 и 22.

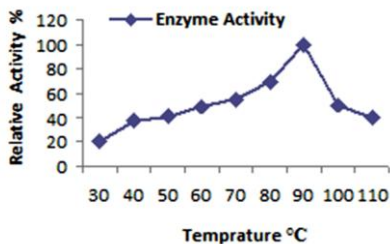


Рис. 21. Влияние температуры на активность α -амилазы

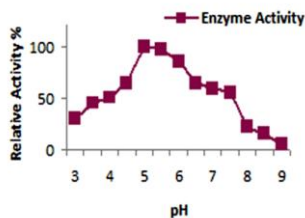


Рис. 22. Влияние pH на активность α -амилазы

Известны многие микробные продуценты термоустойчивых α -амилаз: среди бактерий виды *Bacillus* и родственных родов, такие как *B. amiloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. stearotherophilus*, *Geobacillus* sp. 11PTN и *G. thermoleovorans* subsp. *stramboliensis* применялись для производства термоустойчивой α -амилазы, чтобы выполнять промышленные требования. Термоустойчивые ферменты оптимально активны при температурах выше оптимальной температуры роста хозяина. С другой стороны сообщалось, что оптимальный pH для α -амилаз колеблется между 2 и 12. Сообщалось также, что очень немногие полученные из бацилл термоустойчивые амилазы могут работать при температуре до 100°C и при pH 5.0. Недавно Dheeran et al. изолировали из *Geobacillus* sp. 11PTN новую α -амилазу, которая работала при температуре до 120°C и при pH 5,5. Это был бациллярный штамм, изолированный из горячих источников в Иордании, который образовывал новую высококисло- и термоустойчивую амилазу с оптимумом pH 4.4 и температуры 90°C. α -амилаза *Bacillus* sp. Иранский S1 может также эффективно работать при 110°C и pH 5.0. Способность работать в условиях кислого pH указывает, что фермент слегка кислотоустойчив. α -амилаза, о которой сообщается в настоящем исследовании, отличается от ранее сообщаемых ферментов способностью адаптироваться к экстремальным температурным и pH условиям. Иранский S1 штамм *Bacillus* sp. продуцирует термоустойчивую α -амилазу. Оптимальные температура и pH для активности α -амилазы были 90°C и pH 5.0 соответственно. Фермент остается устойчивым в ряду температуры и pH между 30°C – 110°C и 3 – 9 соответственно. Помимо термоустойчивости новизна фермента состоит в резистентности к слегка кислым условиям. При дальнейшей оптимизации условий образования и очищения α -амилаза *Bacillus* sp. Иранский S1 может быть коммерциализирована.

ВЫВОДЫ

1. На основе фенотипических и филогенетических подходов из геотермальной почвы Гандом-Берен в пустыне Лут были выделены и идентифицированы как представители рода *Bacillus* два штамма термофильных бацилл, продуценты α -амилазы, с температурным оптимумом 56°C и оптимумом pH 7, и два штамма термофильных бацилл, продуцентов α -амилазы, с температурным оптимумом 50°C и оптимумом pH 7 из осадков горячего источника Джовшан.
2. Идентифицированные термофильные изоляты были обозначены как *Bacillus* sp.Иранский S1, *Bacillus* sp. Иранский S2, *Bacillus* sp. B1 и *Bacillus licheniformis* B2, и последовательности их 16S р-ПНК генов были депонированы в GenBank'е под номерами HQ823666, HQ823667, HQ702748 HQ734816, соответственно.
3. Наибольшее образование фермента (96 -293 U/г) бациллярными штаммами при твердофазной ферментации с использованием пшеничных отрубей как субстратов было установлено после 48-72 часов инкубации. Оптимальная температура для образования всех α -амилаз была 50-55°C в интервале pH 5-5,5.
4. Показано, что 10% инокулом (объем на массу) был оптимальным для образования фермента при ТФ всех изученных изолятов. Среди defined углеводов добавление глюкозы (0,05г/г сухого субстрата) и растворимого крахмала увеличило образование α -амилазы на 8,5%. Добавление различных источников азота (0,02 г/г) привело к падению образования фермента у *Bacillus* sp. Иранский S1 и S2.
5. Показано, что наибольшее образование фермента (до 72 U/г) происходит при температуре 55°C и в интервале pH 5 -5,5 для *Bacillus* sp. иранский S1 и S2 при

глубинной ферментации с использованием в качестве субстрата пшеничных отрубей. Добавление различных источников углерода и азота не улучшает в значительной мере образование α -амилазы при ГФ. Образование и активность α -амилаз для всех четырех штаммов были выше при ТФ, чем при ГФ.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Шарифи Алгабпур С.Ф.**, Паносян О.А., Попов Ю.Г. (2012) Выделение и идентифицирование термофильных бацилл из горячего источника Джовшан (Иран, Керман). Сборник тезисов “Биология наука XXI века” XV международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых, Пушкино, Россия, 16-21 апреля, 2012, с. 5-6.
2. **Sharifi Alghabpoor S.F.**, Panosyan H.H., Popov Yu. G., Trchounian A.H. (2012) Isolation and Identification of Two aerobic Thermophilic Bacilli from Jowshan (Iran) Hot Spring. *Reports of NAS of Armenia*, V. 112. N 3, pp. 303-311.
3. **Sharifi Alghabpoor S.F.** (2012) Thermophilic bacill isolated from geothermal soils of Gandom Beryan in Lut desert, Iran and their identification based on phenotypic and phylogenetic approaches. *Biological Journal of Armenia*, Vol. 64, Issue 4, pp. 58-63.
4. **Sharifi Alghabpoor S.F.**, Panosyan H.H., Trchounian A.H., Popov Yu.G. (2013) Purification and characterization of a novel thermostable and acid stable α -amylase from *Bacillus* sp. Iranian S1. *International Journal of Engineering-Transactions B: Applications*, Vol. 26, N 8, pp. 815-820.
5. **Sharifi Alghabpoor S.**, Panosyan H., Popov Yu., Trchounian A. (2013) Production of thermostable *alfa*-amylase by *Bacillus* sp. Iranian S2 using solid state fermentation. Abstract book of International Young Scientists Conference “New aspects in molecular biotechnology and biochemistry” dedicated to the 70th Anniversary of the National Academy of Sciences of Armenia, Yerevan, Armenia, June 27-28, 2013, p. 31.
6. **Sharifi Alghabpoor S.**, Panosyan H., Popov Yu., Trchounian A. (2013) Production of thermostable *alfa*-amylase by *Bacillus* sp. Iranian S2 using solid state fermentation. *Electronic Journal of NAS RA, Natural Science, Biotechnology*, 2 (21), pp. 47-50.

Մոռուր Ֆոսֆի Շարիֆի Ալղաբփուրի

«Իրանի երկրաջերմային աղբյուրից և անապատային հողից մեկուսացված ջերմասեր բացիլները որպես ջերմակայուն և թթվակայուն α -ամիլազների արտադրիչներ»

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր: *Bacillus*, երկրաջերմային աղբյուր անապատ, α -ամիլազ, մակերեսային ֆերմենտացիա, խորքային ֆերմենտացիա, ջերմակայունություն

Ամենատարբեր երկրաջերմային տեղանքներից, ինչպես, օրինակ՝ վերգետնյա ջերմային աղբյուրներից, սուլֆատարաններից, հրաբխային տեղանքներից, բնական տաքացող հողերից և անապատներից մեկուսացվել են բազմաթիվ ջերմասեր մանրէներ: Կուլտիվացիոն և մոլեկուլային մեթոդների հիման վրա կատարված մի

շարք հետազոտություններ պարզել են երկրաջերմային աղբյուրների և անապատային հողերի մանրէային համակեցության յուրահատուկ և արտասովոր կազմը: Ցույց է տրվել որ, վերգետնյա և ստորջրյա երկրաջերմային աղբյուրներում և անապատային հողերում ամենատարածված մանրէները ներկայացված են *Bacillus* և հարակից ցեղերի տեսակներով: Ջերմասեր բացիլների նյութափոխանակային մենահատկությունները դրանց դարձնում են կիրառելի արտադրական և բնապահպանական կենսատեխնոլոգիայում:

Bacillus և հարակից ցեղերի տեսակները արտադրական նշանակություն ունեցող ջերմասեր α -ամիլազների ակտիվ արտադրիչներ են: Մանրէային ծագման α -ամիլազները լայն կիրառություն են գտել սննդի, տեքստիլ, թղթի և դետերգենտների արտադրության, ինչպես նաև կլինիկական, բժշկական և վերլուծական քիմիայի բնագավառներում: Նոր ջերմասեր բացիլների մեկուսացումը և բնութագրումը, որոնք ունակ են արտադրելու միջավայրի ծայրահեղ գործոնների նկատմամբ կայուն α -ամիլազներ, արդիական է: Իրանի Իսլամական Հանրապետությունը հարուստ է երկրաջերմային աղբյուրներով և անապատներով, որոնցում ջերմասեր բացիլների տարածվածությունը և դրանց կենսատեխնոլոգիական ներուժը դեռևս բացահայտված չէ:

Ելնելով վերոհիշյալից աշխատանքի նպատակն է եղել Իրանի Լութ անապատի հողային նմուշներից և Ջովշան երկրաջերմային աղբյուրների ջրատղմային նմուշներից մեկուսացնել և նույնականացնել օսլան ճեղքող ջերմակայուն և թթվակայուն α -ամիլազ արտադրիչ ջերմասեր բացիլներ, ինչպես նաև ուսումնասիրել դրանց α -ամիլազների արտադրությունն ու ակտիվությունը մակերեսային և խորքային ֆերմենտացիայի պայմաններում:

Իրանի Լութ անապատի Գանդում-Բեյյան տեղամասի երկրաջերմային հողերից և Ջովշանի երկրաջերմային աղբյուրի ջրատղմային նմուշներից մեկուսացվել են 50-56 °C ջերմաստիճանային և pH 7 օպտիմում ունեցող ջերմասեր աերոբ էնդոսպոր առաջացնող բակտերիաների 4 կուլտուրաներ, որոնք ֆենոտիպական հատկանիշների և ֆիլոգենետիկական վերլուծության հիման վրա նույնականացվել են որպես *Bacillus* ցեղի տեսակներ, իսկ դրանց 16S rDNA-ի գեների նուկլեոտիդային հաջորդականությունները ավանդադրվել են GenBank-ում HQ823666, HQ823667, HQ702748 և HQ734816 գրանցահամարներով:

Ուսումնասիրվել է մեկուսացված շտամների ջերմակայուն α -ամիլազների արտադրությունը մակերեսային և խորքային ֆերմենտացիայի պայմաններում որպես հումք կիրառելով ցորենի թեփի արտադրական թափոնը: Ցույց է տրվել, որ մակերեսային ֆերմենտացիայի ընթացքում ֆերմենտը իր առավելագույն արտադրության (96-293 U/g) հասնում է 48-72 ժամում, 50-55 °C ջերմաստիճանի և pH 5-5.5 պայմաններում: Խորքային ֆերմենտացիայի ընթացքում *Bacillus* sp. Iranian S1 and S2 շտամների ամիլազների առավելագույն արտադրությունը (72 U/g) դիտվում է 50-55 °C ջերմաստիճանի և pH 5-5.5 պայմաններում:

Ուսումնասիրվել է ինոկուլյանտի չափի, ածխածնի և ազոտի լրացուցիչ աղբյուրների ազդեցությունը ամիլազների արտադրության վրա: Հաստատվել է, որ բոլոր ուսումնասիրված շտամների ամիլազների առավելագույն արտադրությունը դիտվում է երբ ինոկուլյատրկազմում է 10 % (ծավալ/զանգված): Մակերեսային

Ֆերմենտացիայի պայամաններում 0.05 գ գլյուկոզի կամ լուծելի օսլայի ավելացումը ռեակցիոն խառնուրդին բարելավում է ամիլազի արտադրությունը, այն դեպքում, երբ խորքային ֆերմենտացիայի պայամաններում ածխածնի աղբյուրների ավելացումը էական ազդեցություն չի ունենում ամիլազի արտադրության վրա: Ազոտի լրացուցիչ աղբյուրների ավելացումը ընդհակառակը նվազեցնում է ամիլազների արտադրությունը թե մակերեսային, և թե խորքային ֆերմենտացիայի պայամաններում:

Իզոպրոպանոլային նստեցման, DEAE-ցելյուլոզ DE-52 հիմքով իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայի և Sephadex G-100 ժել ֆիլտրացման միջոցով մաքրվել են շտամների ամիլազները և որոշվել է դրանց մոլեկուլային կշիռները: SDS-PAGE էլեկտրաֆորեզային մեթոդով հաստատվել է որ *Bacillus* sp. B1 and *Bacillus licheniformis* B2 շտամներից անջատված և մաքրված ամիլազները ունեն 36 կԴա կշիռ, *Bacillus* sp. Iranian S2 շտամի ամիլազը՝ 70 կԴա, իսկ *Bacillus* sp. Iranian S1-ը՝ 28 կԴա կշիռ: Ցույց է տրվել, որ ամիլազները բնորոշվել են ջերմակայունությամբ և թթվակայունությամբ: Մաքրված ամիլազները կայուն են 30°C-110°C ջերմաստիճանի և pH 3-9 միջակայքում: Ֆերմենտի մաքրման և արտադրության պայամանների օպտիմալացումը թույլ կտա այն կիրառել արտադրական պայամաններում:

SOROUR FOAD SHARIFI ALGHABPOOR

THEMOPHILIC BACILLI ISOLATED FROM IRANIAN HOT SPRING AND DESERT SOIL AS PRODUSERS OF THERMOSTABLE AND ACIDSTABLE α -AMYLASE

SUMMARY

Key words: *Bacillus*, geothermal spring, desert, α -amylases, solid state fermentation, submerged fermentation, thermostability

A number of thermophiles have been isolated from variety of geothermal environments such as terrestrial hot springs and hydrothermal vents, sulfataric fields, volcanic area, solar-heated soils and deserts. Several investigations based on culture-dependant and molecular methods showed a unique and extraordinary microbial diversity in hot spring and desert soils. It was shown members of the genus *Bacillus* and related genera are the most frequently isolated thermophilic aerobes from terrestrial and marine hot water environments and deserts. Metabolic capabilities of thermophilic bacilli suggest that they may have significant biotechnological applications in industrial and also environmental fields. Representatives of *Bacillus* and related genera have been found to be

the best candidate for commercial production of thermostable α -amylases. A large number of microbial α -amylases have applications in food, textile, paper and detergent industries and many other fields such as clinical, medicinal and analytical chemistry.

The isolation and characterization of new thermophilic bacilli able to produce amylases with high stability at extreme conditions is still required. Islamic Republic of Iran is rich in geothermal springs and desert, but the distribution of thermophilic bacilli and their biotechnological potential in this ecotopes, scantily known.

The aim of the research work was to isolate starch-digesting thermostable and acidstable α -amylases producing thermophilic bacilli from the Lut desert and hot springs of Jowshan, Iran, purification and biochemical characterization their α -amylases, as well as the study production and activity of α -amylases under solid state and submerged fermentation.

Two α -amylase producer thermophilic bacilli strains with temperature optimum 56 °C and pH optimum 7 from the geothermal soil of Gandom-Beryan in Lut desert and two α -amylase producer thermophilic bacilli strains with temperature optimum 50 °C and pH optimum 7 from the sediments from Jowshan hot spring were isolated. Isolates were identified based on phenotypic and phylogenetic approaches as representatives of genus *Bacillus* deposited in GenBank under accession numbers HQ823666, HQ823667, HQ702748 and HQ734816, respectively.

The production of thermostable α -amylases by isolated bacilli under SSF and SMF using as substrate wheat bran producing waste was studied. It was shown the highest enzyme production (96-293 U/g) by bacilli strains under solid-state fermentation using wheat bran as substrates was shown after 48-72 h incubation. The optimum temperature for all α -amylases production was observed at the temperature 50-55 °C and pH 5-5.5 interval. The highest enzyme production (up to 72 U/g) at the temperature 55 °C and pH 5-5.5 interval by *Bacillus* sp. Iranian S1 and S2 under submerged fermentation using wheat bran as substrates was shown.

The effect of inoculum size, additional carbon and nitrogen sources on the production of α -amylase was studied. 10 % (volume per mass) inoculum was optimum for the enzymes production under SSF for all studied isolates. Among the defined carbohydrates, the addition of glucose (0.05 g/g dry substrate) or soluble starch has improved the production of α -amylase. Addition of different carbon sources has not significantly improved the production of α -amylase under SMF. Supplementation of different nitrogen sources (0.02 g/g) showed decline in enzyme production for studied isolates under both SSF and SMF.

Purification of α -amylase by isopropanol sedimentation, ion-exchange chromatography on DEAE cellulose DE-52 and gel filtration on Sephadex G-100 were done and molecular weight of purified starch-digesting α -amylase were determined

The molecular weight of studied α -amylases were estimated around 36 KDa (for *Bacillus* sp. B1 and *Bacillus licheniformis* B2), 28 KDa (*Bacillus* sp. Iranian S1) and 70 KDa (*Bacillus* sp. Iranian S2) by SDS-PAGE. They were were stable in a wide range of temperature and pH between 30°C-110°C and 3-9, respectively. Besides thermostability, the novelty of the enzyme is the resistance at slightly acidic pH conditions. Further optimization of enzyme production and purification conditions α -amylase of isolates can be commercialized.