

БИОЛОГИЯ

УДК 577.15+579.22

Л. И. САПУНОВА¹, А. А. КОСТЕНЕВИЧ¹, академик А. Г. ЛОБАНОК¹, И. О. ТАМКОВИЧ¹,
С. А. КУЛИШ¹, Д. П. БАЖАНОВ², К. К. ЯЦЕВИЧ²

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *ARTHROBACTER*
И ИХ ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск²Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

Поступило 04.08.2014

Введение. Бактерии рода *Arthrobacter* представляют собой гетерогенную группу преимущественно сапрофитных аэробных грамположительных бактерий, утилизирующих разнообразные соединения неорганической и органической природы. Отдельные представители этого рода прокарриот являются коммерческими продуцентами биологически активных веществ, включая ферменты [1; 2]. Однако для большинства бактерий рода *Arthrobacter* характерен невысокий уровень синтеза вне- или внутриклеточных ферментов, участвующих в превращении природных органических соединений [3–13].

Ранее нами среди культур, предварительно идентифицированных как *Arthrobacter species*, были отобраны и селективированы штаммы – высокоактивные продуценты глюкозоизомеразы [14] и β-галактозидазы [15]. Показана возможность использования штамма *Arthrobacter sp.*, продуцирующего β-галактозидазу трансгалактозилирующего действия, для получения кормовой добавки пребиотического действия из цельного или обезжиренного молока и отходов его переработки. Эффективность получаемого кормового продукта может быть повышена путем ферментативного гидролиза жиров, казеина и других белков, содержащихся в указанных субстратах и вызывающих у животных диспепсию и аллергические реакции. Существенное улучшение функциональных свойств кормовой добавки, кроме того, возможно за счет дополнения ферментного комплекса штамма-продуцента глюкозо(ксилозо)изомеразой: совместно с β-галактозидазой фермент в среде с лактозой катализирует синтез лактулозы – олигосахарида пребиотического действия.

Цель исследования – характеристика комплекса продуцируемых бактериями рода *Arthrobacter* ферментов, участвующих в превращении входящих в состав молока ингредиентов – белков, жиров и углеводов.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования явились культуры бактерий рода *Arthrobacter* из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов и коллекции лаборатории ферментов Института микробиологии НАН Беларуси.

Скрининг продуцируемых бактериями ферментов, участвующих в гидролизе лактозы, казеина и липидов, проводили в два этапа. На первом из них использовали чашечный метод, который предусматривает выращивание бактерий при 26–28 °С в течение 72 ч на пептонно-дрожжевом агаре (в %: пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; K₂HPO₄ – 0,3; MgSO₄·7H₂O – 0,1; агар-агар – 2,0; pH 6,8), содержащем субстраты исследуемых ферментов в количестве 1,0 %. Для индукции синтеза β-галактозидазы в среду культивирования бактерий вводили лактозу, протеазы – казеинат натрия, липазы – глицерилтрибутират (трибутирин), α-амилазы – крахмал, глюкозо(ксилозо)изомеразы – D-ксилозу.

Активность липолитических, протеолитических и амилолитических ферментов обнаруживали по зонам просветления, которые образуются вокруг колоний исследуемых культур в результате ферментативного гидролиза специфических субстратов. Колонии синтезирующих β -галактозидазу бактерий в присутствии индикатора 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозида (40 мМ) приобретали синий цвет, характерный для продукта его ферментативного гидролиза – 5-бром-4-хлориндиго. Колонии культур, продуцирующих глюкозо(ксилозо)изомеразу, становились темно-розового цвета вследствие окисления D-ксилозой – продуктом ферментативной изомеризации D-ксилозы – бесцветного хлорида 2,3,5-трифенилтетразолия с образованием окрашенного в соответствующий цвет формазана.

На втором этапе проводили количественную оценку эффективности синтеза ферментов исследуемыми культурами в условиях глубинного культивирования в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 50 мл питательной среды, на качалке (180–200 об/мин) при 28–30 °С в течение 3 сут.

Питательная среда для глубинного выращивания бактерий включала (в %): пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; K_2HPO_4 – 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; исходный pH – 6,8. В качестве источника углеводного питания (1,0 % по весу) и индуктора синтеза β -галактозидазы использовали лактозу, липазы – оливковое масло, протеазы – казеинат натрия, α -амилазы – крахмал, глюкозо(ксилозо)изомеразы – D-ксилозу.

Питательная среда на основе цельного молока (белки – 2,8 %, жиры – 3,8 %, углеводы – 4,7 %) использована в качестве комплексного субстрата для синтеза бактериями комплекса ферментов.

Для инокуляции питательной среды использовали 4 об. % водной суспензии клеток бактерий, выращенных на пептонно-дрожжевом агаре при 28–30 °С в течение 3 сут.

Для определения активности ферментов использовали биомассу бактерий, отделенную от культуральной жидкости центрифугированием (8000 г, 20 мин) и дважды промытую дистиллированной водой, а также бесклеточный супернатант.

Активность β -галактозидазы определяли спектрофотометрическим методом (40 °С, pH 7,0, субстрат – *o*-нитрофенил- β -D-галактозид) [16], протеиназы – методом Ансона (37 °С, pH 7,0, субстрат – казеинат натрия) в модификации [17], липазы – титрометрическим методом (37 °С, pH 7,5, субстрат – оливковое масло) [18], глюкозо(ксилозо)изомеразы – цистеин-карбазольным методом (40 °С, pH 7,8, субстрат – ксилоза) [19], α -амилазы (40 °С, pH 7,8, субстрат – крахмал растворимый) согласно [20].

За единицу активности ферментов принимали такое их количество, которое в условиях проведения реакции за 1 мин катализирует образование из субстрата 1 мкмоль продукта. Активность ферментов выражали в условных единицах в расчете на 1 мл культуральной жидкости (ед/мл).

Для выявления галактоолигосахаридов, синтезируемых бактериями в питательной среде на основе цельного молока, бесклеточные фильтраты культуральной жидкости для инактивации ферментов выдерживали в течение 5–10 мин на кипящей водяной бане, охлаждали и после разбавления дистиллированной водой наносили на хроматографические пластины в количестве 1,0–1,5 мкл. Разделение маркерных углеводов (глюкоза, галактоза, лактоза) и сахаридов культуральной жидкости проводили методом восходящей тонкослойной хроматографии на пластинах Silufol (Kavalier, Чехия) в системе изопропанол–этилацетат–вода (2 : 2 : 1). Продукты разделения проявляли 0,2 %-ным раствором β -нафторезорцина в 96 %-ном этиловом спирте, содержащем 10 об. % ортофосфорной кислоты, при температуре 110 °С в течение 5 мин. Документирование полученных результатов проводили сканированием хроматографических пластин.

Молекулярно-генетическую идентификацию бактериальных культур проводили методом анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рПНК. Для этого их геномную ДНК выделяли с использованием набора Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Литва), придерживаясь рекомендаций производителя. Матрицы для секвенирования синтезировали ПЦР-методом, используя праймеры fD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') и rP2 (5' ACGGCTACCT TGTTACGACTT 3') [21], что позволяло практически полностью амплифицировать ген 16S рПНК, за исключением его коротких концевых участков.

Реакционная смесь (30 мкл) содержала 3 мкл 10х реакционного буфера (Диалат Лтд., Россия), 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, по 30 пкмоль каждого из праймеров, 1 единицу активности *Taq*-полимеразы (Диалат Лтд., Россия) и 15 нг геномной ДНК в качестве матрицы.

ПЦР проводили в термоциклере MJ MiniTM (BioRad, США). Реакцию инициировали инкубированием смеси при 95 °С в течение 4 мин, затем следовало 30 циклов, состоящих из инкубаций: 94 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 2 мин. Завершающую элонгацию проводили при 72 °С в течение 7 мин. Продукты амплификации разделяли в 1 %-ном агарозном геле. Фрагменты размером около 1,5 т.п.н. вырезали и очищали с помощью набора DNA Extraction Kit (Fermentas, Литва) согласно инструкциям производителя.

Секвенирование фрагментов гена 16S рРНК идентифицируемых бактерий проводили на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), придерживаясь рекомендаций производителя. При проведении «секвенирующей ПЦР» помимо праймеров fD1 и rP2 использовали «внутренний» праймер 960r (5' GCTTGTGCGGGYCCCCG 3') [22].

Полученные в результате секвенирования данные обрабатывали с использованием программы Sequencing Analysis Software v5.2 (Applied Biosystems, США).

Поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК осуществляли с помощью программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) в базе данных GenBank Национального центра биотехнологической информации США [23]. Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA4 [24], используя алгоритм «объединения соседей».

Приведенные результаты представляют собой усредненные величины 2–3 опытов, выполненных в трех повторностях и статистически обработанных с использованием компьютерных программ из пакета Microsoft Windows.

Результаты и их обсуждение. Ранее было установлено отсутствие корреляции между способностью бактерий рода *Arthrobacter* расти на агаризованных средах со специфическими субстратами и синтезом ими β-галактозидазы [25] и липазы [26]. Аналогично из 14 исследованных нами представителей этой группы микроорганизмов, активно растущих на агаризованной среде с крахмалом в качестве единственного источника углерода, только 4 (*Arthrobacter* sp. GP-3, *Arthrobacter* sp. GP-4, *A. globiformis* БИМ В-10 и *A. oxydans* БИМ В-248) образовывали зоны гидролиза субстрата диаметром от 3–4 до 8–10 мм и в условиях глубинного культивирования синтезировали α-амилазу в количестве 0,002–0,097 ед/мл (табл. 1). В то же время штамм *A. nicotianae* БИМ В-5, не формирующий зон гидролиза крахмала в процессе роста на агаризованной среде, характеризовался в 4,3–206,5 раза более высоким, чем названные выше культуры, уровнем внеклеточной амилолитической активности (0,413 ед/мл).

Т а б л и ц а 1. Характеристика внеклеточной ферментативной активности бактерий рода *Arthrobacter*, растущих в средах со специфическими субстратами

Бактерия	Активность (ед/мл):				
	липазы	β-галактозидазы	протеазы	α-амилазы	глюкозо(ксилозо)изомеры
<i>Arthrobacter</i> sp. GP-3	0,156 ± 0,0078	0,23 ± 0,001	0	0,002 ± 0,0001	0
<i>Arthrobacter</i> sp. GP-4	0,145 ± 0,0073	0,04 ± 0,002	0	0,006 ± 0,0001	0
<i>Arthrobacter</i> sp. БИМ В-2239	0,112 ± 0,0056	6,70 ± 0,312	22,04 ± 0,521	0	0,204 ± 0,009
<i>Arthrobacter</i> sp. БИМ В-2240	0,054 ± 0,0027	18,17 ± 0,890	12,80 ± 0,326	0	0,226 ± 0,010
<i>Arthrobacter</i> sp. БИМ В-2241	0,068 ± 0,0034	16,44 ± 0,811	10,58 ± 0,218	0	0,193 ± 0,008
<i>Arthrobacter</i> sp. БИМ В-2242	0,072 ± 0,0036	24,17 ± 0,905	33,60 ± 1,097	0	0,240 ± 0,011
<i>Arthrobacter</i> sp. БОС В-1761	0,105 ± 0,0053	0,03 ± 0,001	0,01 ± 0,001	0	0
<i>A. citreus</i> БИМ В-3	0,150 ± 0,0075	0,13 ± 0,01	1,87 ± 0,038	0	0
<i>A. crystallopoietes</i> БИМ В-13	0,082 ± 0,0041	0,02 ± 0,001	2,61 ± 0,055	0	0
<i>A. globiformis</i> БИМ В-10	0,102 ± 0,0051	0,01 ± 0,001	0,95 ± 0,036	0,097 ± 0,0035	0
<i>A. globiformis</i> БИМ В-255	0,076 ± 0,0038	0,02 ± 0,001	0,82 ± 0,012	0	0
<i>A. nicotianae</i> БИМ В-5	0,120 ± 0,0060	0,02 ± 0,001	3,50 ± 0,041	0,413 ± 0,0312	0,285 ± 0,012
<i>A. oxydans</i> БИМ В-248	0,115 ± 0,0058	0,52 ± 0,031	2,51 ± 0,068	0,006 ± 0,0001	0
<i>A. ureafaciens</i> БИМ В-6	0,108 ± 0,0054	0,09 ± 0,001	6,86 ± 0,223	0	0,186 ± 0,008

В свою очередь, все предварительно отобранные на агаризованных питательных средах с казеинатом натрия (87,5 %, или 12 штаммов) и D-ксилозой (42,9 %, или 6 штаммов) культуры при их выращивании в жидких питательных средах с соответствующими субстратами синтезировали протеазу и глюкозо(ксилозо)изомеразу. Согласно приведенным в табл. 1 данным, диапазон их внеклеточной протеолитической активности варьировался от 0,01 у *Arthrobacter* sp. БОС В-1761 до 33,60 ед/мл у *Arthrobacter* sp. БИМ В-2242, глюкозо(ксилозо)изомеразной – в пределах 0,186–0,226 ед/мл у *A. ureafaciens* БИМ В-6 и *Arthrobacter* sp. БИМ В-2240 соответственно. Причем, для обоих ферментов отмечалась прямая зависимость между величиной внеклеточной активности и размером зон просветления субстрата (протеаза) или интенсивностью окраски их колоний (глюкозо(ксилозо)изомеразы).

Суммируя полученные данные о ферментативной активности исследуемых бактерий рода *Arthrobacter*, следует заметить, что свойство синтезировать весь комплекс исследуемых ферментов в средах со специфическими субстратами выявлено лишь у *A. nicotianaе* БИМ В-5. Однако этому штамму при максимальном уровне синтеза протеазы (0,413 ед/мл) и глюкозо(ксилозо)изомеразы (0,285 ед/мл), а также сопоставимой с другими исследованными культурами активностью липазы (0,120 ед/мл) была свойственна невысокая β -галактозидазная (0,02 ед/мл) и протеазная (3,50 ед/мл) активность.

Наиболее сбалансированными по компонентному составу и активности оказались внеклеточные ферментные комплексы штаммов БИМ В-2239, БИМ В-2240, БИМ В-2241 и БИМ В-2242 *Arthrobacter* sp., растущих в средах со специфическими субстратами (табл. 1). Их преимуществом перед другими исследованными культурами является высокий уровень продукции β -галактозидазы (6,70–24,17 ед/мл против 0,01–0,52 ед/мл) и протеазы (10,58–33,60 ед/мл против 0,01–6,86 ед/мл) при сопоставимом уровне синтеза липазы (0,054–0,112 ед/мл против 0,076–0,156 ед/мл) и глюкозо(ксилозо)изомеразы (0,193–0,240 ед/мл против 0,186–0,285 ед/мл).

Сходные результаты по составу ферментных комплексов и активности их отдельных компонентов получены при глубинном выращивании штаммов БИМ В-2239, БИМ В-2240, БИМ В-2241 и БИМ В-2242 *Arthrobacter* sp. в питательных средах на основе цельного молока (табл. 2). Установлено, что в условиях эксперимента все названные культуры синтезировали ферментные белки, участвующие в превращении углеводов, белков и жиров молока. Однако только штамм БИМ В-2242 *Arthrobacter* sp. выделялся относительно высоким уровнем продукции одновременно всех исследуемых ферментов. Так, величина накопления им липазы в культуральной жидкости достигала 0,052 ед/мл, протеазы – 25,82 ед/мл, глюкозо(ксилозо)изомеразы – 0,207 ед/мл, β -галактозидазы – 16,8 ед/мл, что соответственно в 1,0–1,7; 1,3–4,1; 1,1–2,0 и 1,6–3,8 раза превышало аналогичные показатели у штаммов БИМ В-2239, БИМ В-2240 и БИМ В-2241 *Arthrobacter* sp.

Т а б л и ц а 2. Состав внеклеточных ферментных комплексов, синтезируемых штаммами БИМ В-2239, БИМ В-2240, БИМ В-2241 и БИМ В-2242 *Arthrobacter* sp. в питательных средах на основе цельного молока

Штамм <i>Arthrobacter</i> sp.	Активность (ед/мл):			
	липазы	β -галактозидазы	протеазы	глюкозо(ксилозо)изомеры*
БИМ В-2239	0,052 \pm 0,0021	4,37 \pm 0,198	19,35 \pm 0,423	0,102 \pm 0,004
БИМ В-2240	0,031 \pm 0,0013	10,50 \pm 0,465	7,95 \pm 0,103	0,183 \pm 0,009
БИМ В-2241	0,040 \pm 0,0017	8,67 \pm 0,393	6,24 \pm 0,195	0,148 \pm 0,006
БИМ В-2242	0,052 \pm 0,0022	16,80 \pm 0,547	25,82 \pm 0,924	0,207 \pm 0,008

П р и м е ч а н и е: * – среда дополнительно содержала 0,5 % ксилозы.

Согласно данным хроматографического анализа, в культуральных жидкостях штаммов БИМ В-2239, БИМ В-2240, БИМ В-2241 и БИМ В-2242 *Arthrobacter* sp. наряду с остатками неупотребленной лактозы молока обнаруживались сахарады существенно большей молекулярной массы (рис. 1). Причем, количество галактоолигосахаридов, синтезированных *in vivo* из продуктов ферментативного гидролиза лактозы, существенно различалось и коррелировало с активностью β -галактозидазы исследуемых культур.

С целью выбора штамма для разработки на его основе биотехнологии получения из молочного сырья кормовой добавки планируется более детально исследовать эффективность гидролиза белков и жиров, а также трансформации лактозы молока и продуктов ее гидролиза с участием липаз, протеаз, β -галактозидаз и глюкозо(ксилозо)изомераз, синтезируемых штаммами БИМ В-2239, БИМ В-2240, БИМ В-2241 и БИМ В-2242 *Arthrobacter* sp.

Для уточнения таксономической принадлежности отобранных штаммов, которые на основании культурально-морфологических и физиолого-биохимических особенностей были предварительно отнесены к роду *Arthrobacter*, проводили анализ нуклеотидных последовательностей их генов 16S рРНК. В результате выполненных исследований определены нуклеотидные последовательности указанных генов изолятов БИМ В-2239, БИМ В-2240, БИМ В-2241 и БИМ В-2242 на протяженности более 1400 п. о. и депонированы в GenBank (коды доступа KF537268, KF537269, KF537270 и KF537271 соответственно). Результаты BLAST-поиска в упомянутой базе данных показали, что гены 16S рРНК исследуемых бактерий действительно имеют наибольшую степень сходства с соответствующими генами бактерий рода *Arthrobacter*, относящегося к семейству *Micrococcaceae*.

При попарном сравнении нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК установлено их максимальное сходство (99,3 %) у изолятов В2239, В2240, В2241, В2242 *Arthrobacter* sp. и типового штамма *Arthrobacter sulfonivorans* DSM 14002^T (табл. 3). Филогенетический анализ, учитывающий степень сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК исследуемых бактерий и типовых штаммов рода *Arthrobacter*, также показал наибольшую близость изолятов БИМ В-2239, БИМ В-2240, БИМ В-2241 и БИМ В-2242 и типового штамма *Arthrobacter sulfonivorans* DSM 14002^T (рис. 2). При этом значение бутстрапа находилось на высоком уровне (92) для всей сформированной ветви, что свидетельствует о статистической достоверности кластеризации.

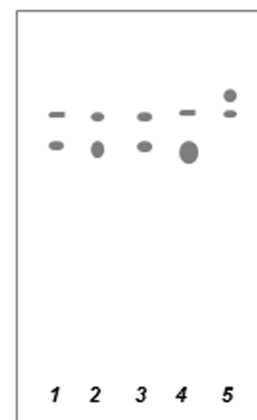


Рис. 1. Хроматограмма сахаридов культуральной жидкости штаммов В2239 (1), В2240 (2), В2241 (3) и В2242 (4) *Arthrobacter* sp. и маркерных углеводов – смеси глюкозы + галактозы и лактозы (5)

Т а б л и ц а 3. Сходство нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК бактерий рода *Arthrobacter* и родственных типовых и референтных штаммов из базы данных GenBank, %

Вид бактерий	Код доступа в GenBank	Степень сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК штаммов, %			
		B2239	B2240	B2241	B2242
		на участке длиной, н.			
		1435	1435	1439	1436
<i>A. sulfonivorans</i> DSM 14002 ^T	NR_025084	99,5	99,5	99,3	99,5
<i>A. polychromogenes</i> DSM20136 ^T	NR_026192	98,3	98,3	98,1	98,3
<i>A. oxydans</i> DSM 20119 ^T	NR_026236	98,2	98,2	98,0	98,2
<i>A. equi</i> IMMIB L-1606 ^T	FN673551	98,2	98,2	98,0	98,2
<i>A. oryzae</i> KV-651 ^T	NR_041545	98,1	98,1	98,0	98,1
<i>A. defluvii</i> 4C1-a	NR_042573	98,1	98,1	97,9	98,1
<i>A. defluvii</i> 4C1-b ^T	AM409362	98,1	98,1	97,9	98,1
<i>A. ramosus</i> DSM 20546 ^T	NR_026193	98,0	98,0	97,8	98,0
<i>A. pascens</i> DSM 20545 ^T	NR_026191	98,0	98,0	97,8	98,0
<i>A. phenanthrenivorans</i> Sphe3 ^T	NR_042469	98,0	98,0	97,8	98,0
<i>A. scleromae</i> YH-2001 ^T	NR_041824	97,9	97,9	97,7	97,9
<i>A. niigatensis</i> LC4 ^T	NR_041400	97,8	97,8	97,6	97,8
<i>A. humicola</i> KV-653 ^T	NR_041546	97,8	97,8	97,6	97,8
<i>A. globiformis</i> DSM 20124 ^T	NR_026187	97,6	97,6	97,5	97,6
<i>A. chlorophenicus</i> A-6 ^T	NR_024954	97,6	97,6	97,4	97,6
<i>A. roseus</i> DSM 14508 ^T	AJ278870	97,4	97,4	97,1	97,4
<i>A. cryotolerans</i> LI3 ^T	GQ406812	97,2	97,2	97,0	97,2
<i>A. livingstonensis</i> LI2 ^T	GQ406811	96,7	96,7	96,5	96,7

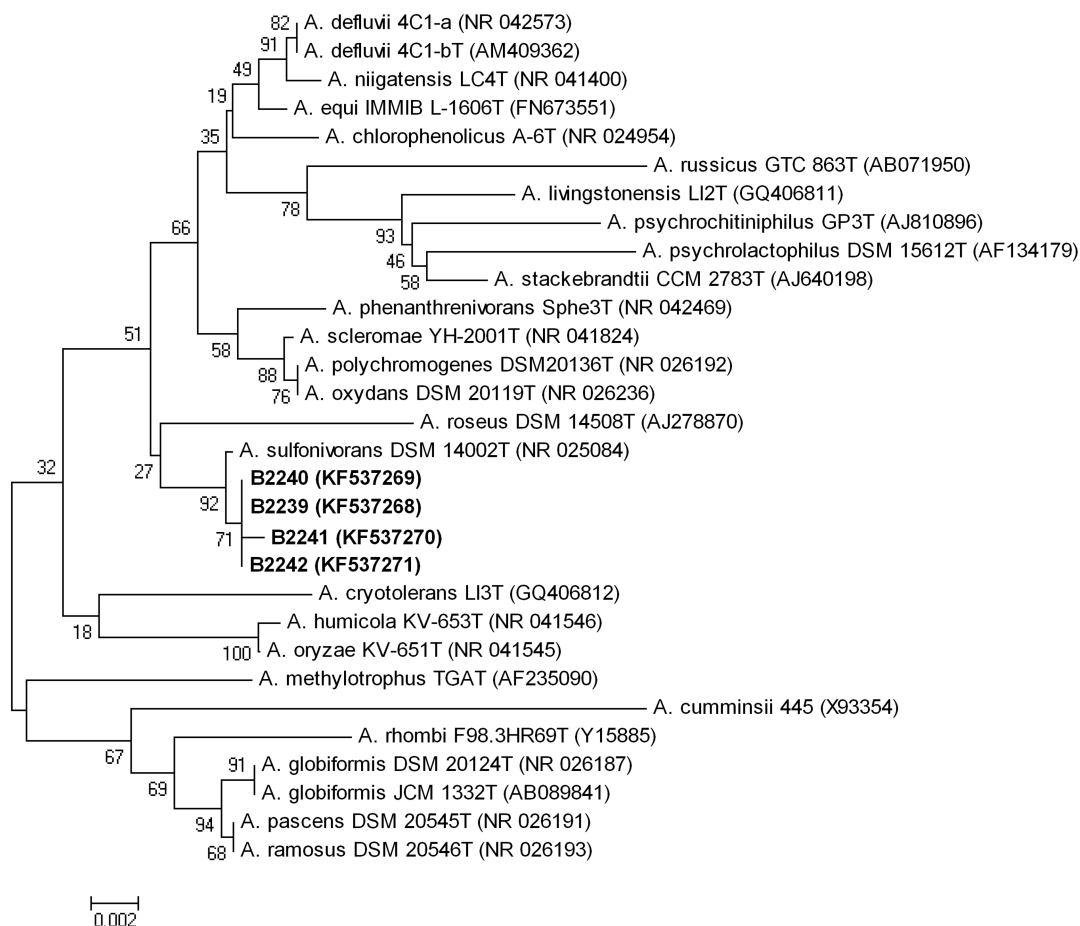


Рис. 2. Филогенетическое древо, отражающее родство штаммов B2239, B2240, B2241, B2242 *Arthrobacter* sp. и типовых штаммов рода *Arthrobacter*. В скобках приведены номера доступа последовательностей в GenBank. Блок сравнения включает 1063 нуклеотида. Значения бутстрапа вычислены на основании анализа 1000 деревьев. Линейка соответствует 0,002 замене на нуклеотидную позицию

Заключение. У бактерий рода *Arthrobacter* проведен двухступенчатый скрининг ферментов, участвующих в трансформации белков, жиров и углеводов – липаз, протеаз, β -галактозидаз и глюкозо(ксилозо)изомераз. Определены состав ферментных комплексов, продуцируемых исследуемыми культурами в средах со специфическим субстратом, и активность их отдельных компонентов. Установлено, что наиболее сбалансированными по компонентному составу и активности являются ферментные комплексы штаммов БИМ В-2239, БИМ В-2240, БИМ В-2241 и БИМ В-2242 *Arthrobacter* sp.

Определены и депонированы в базе данных GenBank нуклеотидные последовательности генов 16S рНК изолятов БИМ В-2239, БИМ В-2240, БИМ В-2241 и БИМ В-2242 *Arthrobacter* sp. размером более 1400 п. о. Принимая во внимание высокий уровень отличий между нуклеотидными последовательностями генов 16S рНК представителей рода *Arthrobacter* и типового штамма *A. sulfonivorans* DSM 14002^T (1,5–2 % между близкими вариантами в пределах рода), высокую (более 99,3 %) степень сходства анализируемых последовательностей у исследуемых и типового штаммов, высокое (92) значение результатов бутстрап-анализа для кластера *A. sulfonivorans*, изоляты БИМ В-2239, БИМ В-2240, БИМ В-2241 и БИМ В-2242 идентифицированы как *Arthrobacter sulfonivorans*.

Планируется детальное исследование условий эффективного гидролиза белков и жиров с участием липаз и протеаз, а также трансформации лактозы молока и продуктов ее гидролиза с участием β -галактозидаз и глюкозо(ксилозо)изомераз штаммов БИМ В-2239, БИМ В-2240, БИМ В-2241 и БИМ В-2242 *Arthrobacter sulfonivorans* с целью выбора продуцента для разработки биотехнологии получения из молочного сырья гипоаллергенной биологически активной кормовой добавки пребиотического действия.

Литература

1. Квасников Е. И., Писарчук Е. Н. Артробактер в природе и производстве. Киев, 1980. – 220 с.
2. Comi G., Cantoni C. // Psychrotrophic Bacteria. 2002. Vol. 1. P. 111–116.
3. John E., Hampel W. A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1991. Vol. 35, N 1. P. 60–64.
4. Latzko F., Hampel W. A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993. Vol. 40, N 1. P. 12–16.
5. Latzko F., Hampel W. A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995. Vol. 44, N 1–2. P. 185–189.
6. Lobanok A. G., Sapunova L. I., Dikhtievski Ya. O. et al. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1998. Vol. 14, N 2. P. 259–262.
7. Khandeparkar R., Bhosle N. B. // Bioresour. Technol. 2007. Vol. 98, N 4. P. 897–903.
8. Nakagawa T., Ikehata R., Myoda T. et al. // Protein Expression Purif. 2007. Vol. 54, N 2. P. 295–299.
9. Brushan I., Yadav A. K., Parshad R. // Asiatic J. Biothechnol. Res. 2011. Vol. 2, N 5. P. 522–534.
10. Siala R., Fakhfakh N., Hamza-Mnif I. et al. // Biotechnol. Bioprocess Eng. 2012. Vol. 17, N 3. P. 556–564.
11. Soares F. L. Jr., Melo I. S., Dias A. C. et al. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. Vol. 28, N 5. P. 2195–2203.
12. Chu J., Wu X., Wu B. et al. // J. Agric. Food Chem. 2014. Vol. 62, N 24. P. 5408–5411.
13. Smith M. R., Zahnley J. C. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2005. Vol. 32, N 7. P. 277–283.
14. Патент 11170 Респ. Беларусь. № а20061327; заявл. 22.12.2006; опубл. 30.10.2008.
15. Патент 15050 Респ. Беларусь. а 20091062; заявл. 14.07.2009; опубл. 28.02.2011.
16. Kuby S. A., Lardy H. A. // J. Amer. Chem. Soc. 1953. Vol. 75, N 4. P. 890–896.
17. ГОСТ 20264.2–88. Введ. 01.07.90. М., 1988. – 11 с.
18. Yang G., Wu J., Xu G. et al. // Bioresour. Technol. 2009. Vol. 100, N 19. P. 4311–4316.
19. Dische Z., Borenfreund E. // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 192, N 2. P. 583–587.
20. ГОСТ 20264–89. Введ. 01.07.90. М., 1989. – 17 с.
21. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A. // J. Bacteriol. 1991. Vol. 173, N 2. P. 697–703.
22. Reed D. L., Hafner M. S. // Microbial Ecol. 2002. Vol. 44, N 1. P. 78–93.
23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
24. Tamura K., Dudley J., Nei M. et al. // Mol. Biol. Evolut. 2007. Vol. 24, N 8. P. 1596–1599.
25. Ерхова Л. В., Костеневич А. А., Лобанок А. Г. и др. // Докл. НАН Беларуси. 2013. Т. 57, № 5. С. 77–80.
26. Сапунова Л. И., Костеневич А. А., Лобанок А. Г. и др. // Докл. НАН Беларуси. 2013. Т. 57, № 6. С. 70–74.

L. I. SAPUNOVA, A. A. KASTSIANEVICH, A. G. LOBANOK, I. O. TAMKOVICH, S. A. KULISH,
D. P. BAZHANAU, K. K. YATSEVICH

leonida@mbio.bas-net.by

ENZYMATIC ACTIVITY OF *ARTHROBACTER* GENUS BACTERIA AND THEIR GENOTYPIC IDENTIFICATION

Summary

Two-stage screening enabled one to define the composition of enzyme complexes produced by bacteria of genus *Arthrobacter* in media with specific substrates and activity of individual constituents involved in the transformation of milk proteins, lipids and carbohydrates. It was found that enzyme complexes of *Arthrobacter* strains BIM B-2239, BIM B-2240, BIM B-2241 and BIM B-2242 showed the most balanced activity of lipase, protease, β -galactosidase and glucose(xylose)isomerase components. Following the nucleotide sequence analysis of 16S rRNA gene the examined cultures were identified as *Arthrobacter sulfonivorans*. 16S rRNA gene sequences over 1400 bp in size were deposited in GenBank database.

Detailed investigation of conditions favoring the efficient hydrolysis of proteins and lipids by proteases and lipases produced by *Arthrobacter sulfonivorans* strains BIM B-2239, BIM B-2240, BIM B-2241, BIM B-2242 and the transformation of milk lactose and derived hydrolysis products mediated by β -galactosidases and glucose(xylose)isomerases will allow one to select microbial strain to develop the biotechnology of manufacturing hypoallergenic feed additive with prebiotic activity from dairy substrates.