



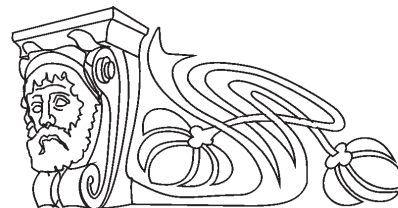
16. Шилова А. И. К систематике *Cryptochironomus* gr. defectus Kief. (Diptera, Chironomidae) // Тр. Ин-та биол. внутр. вод АН СССР. 1966. Т. 12(15). С. 214–238.
17. Шилова А. И. Семейство Chironomidae (Tendipedidae)-звонцы // Определитель насекомых Европейской части СССР. Л., 1969. Т. 5. С. 163–201.
18. Шилова А. И. Хируномиды Рыбинского водохранилища. Л., 1976. 249 с.
19. Морозова Е. Е. Эколого-морфологический анализ хируномид рода *Cryptochironomus* Kieffer (Diptera, Chironomidae) Палеартики : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Саратов, 2008. 48 с.

УДК 579.25

## СЕЛЕКЦИЯ ШТАММОВ *ALCALIGENES DENITRIFICANS* ВКПМ В-9582 И ВКМ В-2243D С ПОВЫШЕННОЙ НИТРИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

С. А. Глинский, С. В. Козулин, Т. Н. Козулина, С. В. Полтавская

Закрытое акционерное общество «Биоамид», Саратов  
E-mail: GlinskiyS@gmail.com



Выявлена и изучена диссоциация штаммов *Alcaligenes denitrificans* ВКПМ В-9582 и ВКМ В-2243D при культивировании на плотных питательных средах различного состава. Создана селективная среда, на которой каждый из вариантов диссоциантов формирует несколько морфологических типов колоний. Установлена корреляция между величиной нитрилазной активности и морфологическими особенностями колоний диссоциантов. Показано, что диссоцианты S-типа проявляют более высокую активность нитрилазы по сравнению с диссоциантами R-типа. Разработан экспресс-метод качественной оценки нитрилазной активности у микроорганизмов. Изучено влияние плотности засева, способа, времени культивирования, условий хранения клеток на их нитрилазную активность. На основании полученных результатов оптимизированы методы поддерживающей селекции, хранения и подготовки клеточного посевного материала.

**Ключевые слова:** штамм *Alcaligenes denitrificans* ВКПМ В-9582, *Alcaligenes denitrificans* ВКМ В-2243D, нитрилаза, нитрилазная активность, селекция, диссоциация, селективная среда, культивирование.

### Selection of Strains *Alcaligenes Denitrificans* VKPM В-9582 and VKM В-2243D Possessing High Nitrilase Activity

S. A. Glinskiy, S. V. Kozulin,  
T. N. Kozulina, S. V. Poltavskaya

Dissociation of strains *Alcaligenes denitrificans* VKM В-2243D and VKPM В-9582, which takes place at cultivation on dense nutrient media having various contents, is detected and studied. Selection medium is created, on which medium each of dissociants forms colonies of several morphological types. Dependence of value of nitrilase activity on morphological features of colonies of dissociants is found. It is shown, that the S-type dissociants show higher nitrilase activity than the R-type ones. Express method of qualitative evaluation of nitrilase activity of microorganisms is developed. Influence of the sowing density, way and time of cultivation, and also conditions of storage of cells on their nitrilase activity is studied. On the basis of the data obtained, methods of maintenance selection, storage and preparation of cellular sowing material are optimized.

**Key words:** strain *Alcaligenes denitrificans* VKPM В-9582, *Alcaligenes denitrificans* VKM В-2243D, nitrilase, nitrilase activity, selection, dissociation, selective medium, cultivation.

### Введение

На сегодняшний день ферментативный катализ в синтезе органических соединений все чаще приходит на смену классическим процессам, принятым в крупнотоннажной химии. Основным источником ферментов для подобных процессов служат микроорганизмы [1]. Одним из успешных примеров использования биокаталитического синтеза является ферментативный гидролиз нитрила акриловой кислоты в акрилат аммония с использованием штамма *Alcaligenes denitrificans* VKM В-2243D, который был изучен в компании ЗАО «Биоамид» и в 2004 г. внедрен в производство [2]. Акриловые мономеры, получаемые биотехнологическим способом, отвечают всем требованиям, необходимым для синтеза полимеров различных марок. Тем не менее, важной критической точкой, определяющей целесообразность использования данного процесса, является выход готового продукта на единицу катализатора. Проведенные испытания опытных партий биокатализатора в процессе получения акриловых мономеров показали его недостаточно высокую продуктивность, что привело к низкой рентабельности производства.

В результате совместной работы сотрудников ЗАО «Биоамид» и ФГУП «ГосНИИГенетика» был получен мутантный штамм *Alcaligenes denitrificans* ВКПМ В-9582 с более высокой нитрилазной активностью [3]. У большинства описанных в литературе микроорганизмов синтез фермента нитрилазы индуцибельный, индукторами являются нитрилы [4–9]. Но известны некоторые культуры



с конститутивной продукцией нитрилазы [2, 10, 11, 12]. Мутантный и дикий штаммы В-9582 и В-2243D синтезировали нитрилазу конститутивно, а присутствие в среде нитрилов незначительно снижало нитрилазную активность и ингибировало рост клеток [13]. В ходе сравнительного исследования штаммов В-9582 и В-2243D была показана нестабильность показателя их нитрилазной активности.

Причиной нестабильной продукции нитрилазы у штаммов В-9582 и В-2243D могла стать диссоциация. В отличие от случайных мутаций диссоциативные переходы обратимы, но происходят с более высокой частотой. По морфологическим отличиям колоний диссоциантов выделяют *R*-, *S*- и *M*-варианты, которые различаются по количеству и качеству синтезируемых практически ценных веществ, преобладание в биомассе того или иного диссоцианта приводит к дестабилизации показателей выхода целевого продукта [14].

Задачей настоящего исследования являлась оптимизация методов селекции клеток штаммов *A. denitrificans* ВКПМ В-9582 и VKM В-2243D для отбора и поддержания клонов с высокой продукцией нитрилазы.

#### Материалы и методы

Для изучения диссоциации, сравнения продукции нитрилазы и селекции активных клонов штаммов *A. denitrificans* VKM В-2243D и ВКПМ В-9582 использовали стандартные микробиологические питательные среды: мясопептонный агар (МПА); LB-среда; питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ) ФГУН Гос. научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Россия, г. Оболensk; триптозный агар (ТА) «HiMedia», Индия, г. Мумбай; nutrient broth bacto (NB) Difco. При необходимости среды уплотняли 1.5% бактериологическим агаром. Кроме того, использовали оригинальные плотные синтетические питательные среды «А», «Г» и «ГМ». Среда «А», (г/л):  $\text{CH}_3\text{COONH}_4 - 5.00$ ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O} - 7.00$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 2.00$ ;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 1.00$ ; этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА) – 0.04;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.02$ ; агар – 15.00; дистиллированная вода; pH 7.5±0.2. Среда «Г», (г/л): глутамат натрия – 5.00;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O} - 7.00$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 2.00$ ;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 1.00$ ; этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА) – 0.04;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.02$ ; агар – 15.00; дистиллированная вода; pH 7.5±0.2. Среда «ГМ», (г/л): глутамат натрия – 12.50;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 - 5.00$ ;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 1.00$ ; этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА) – 0.04;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.02$ ; агар – 15.00; дистиллированная вода; pH 7.8 ± 0.2.

Клетки штаммов В-2243D и В-9582 культивировали на плотных питательных средах в чашках Петри 2–6 сут при температуре 30±1 °С. Количественные показатели нитрилазной активности клеток измеряли постановкой реакции трансформации акрилонитрила в акрилат аммония. С этой целью биомассу суспендировали в 0,01М фосфатном буфере (pH 7,6) до оптической плотности 1.0. Концентрацию клеток определяли фотокориметрическим методом ( $\lambda = 540$  нм,  $l = 5$  мм), принимая, что единица оптической плотности соответствует 0.58 г/л (по сухому весу клеток). Клеточную суспензию в объеме 1 мл переносили в герметичные пластиковые пробирки Эппендорф и помещали их на водяную баню с температурой 20 °С. В пробы вносили акрилонитрил до конечной концентрации 20.0 г/л. Трансформацию проводили при постоянном перемешивании в течение 30 мин. Реакцию останавливали внесением в реакционную смесь 6Н HCl в объеме 0.05 мл. Бактериальные клетки отделяли центрифугированием. Концентрацию акрилата аммония в надосадочной жидкости определяли спектрофотометрическим методом ( $\lambda = 255$  нм,  $l = 10$  мм) по поглощению аниона акриловой кислоты или колориметрическим методом ( $\lambda = 440$  нм,  $l = 20$  мм) с использованием реактива Неслера, определяя содержание ионов аммония.

За единицу нитрилазной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 ммоль акриловой кислоты в единицу времени (1 мин). Удельная нитрилазная активность выражалась числом единиц нитрилазной активности, приходящихся на 1 г сухого веса клеток.

Исследование нитрилазной активности *S*- и *R*-вариантов диссоциантов штаммов В-2243D и В-9582В проводили качественным и количественным методами. Для этого отбирали колонии диссоциантов, высевали методами истощающего штриха и последовательных разведений в чашки Петри на среды ГРМ, «А» и «Г», выращивали 2–5 сут при температуре 30±1 °С до появления изолированных колоний с четко выраженной морфологией. Определение продукции нитрилазы в клетках *S*- и *R*-диссоциантов проводили разработанным нами экспресс-методом качественного определения нитрилазной активности отдельных колоний микроорганизмов на плотных питательных средах.

Принцип метода основан на индикации изменения pH плотной питательной среды и бактериальной колонии, которое происходит за счет накопления продуктов трансформации нитрилов под действием активной нитрилазы микробных клеток.



При культивировании штаммов В-2243D и В-9582 значение рН плотных питательных сред изменялось в щелочную сторону до 8.1–9.0 из-за накопления катионов в процессе утилизации солей органических кислот и аминокислот. Это явление связано с особенностью метаболизма бактерий рода *Alcaligenes* и было отмечено при выращивании исследуемых штаммов на всех питательных средах, описанных выше [15].

После формирования изолированных колоний на поверхности плотной питательной среды через 3–4 сут инкубации чашки помещали в камеру, насыщенную парами пропионитрила, и выдерживали при температуре  $36 \pm 1$  °С в течение 1 ч. Клетки штаммов, обладающие нитрилазной активностью, трансформировали пропионитрил в аммонийную соль пропионовой кислоты, в результате чего значение рН изменялось от щелочного до слабокислого. Соответственно чем выше удельная нитрилазная активность клеток, тем сильнее происходило закисление.

Для определения изменения значения рН в изолированных бактериальных колониях после воздействия паров нитрила использовали экспериментально подобранный индикатор – бромтимоловый синий. Данный индикатор изменяет окраску при переходе от рН 6.0 до 7.6 от желтого до синего [16]. После обработки индикатором поверхность питательной среды приобретала синий цвет, колонии активных клонов окрашивались в желтый цвет, а неактивных оставались бесцветными.

Изучение морфологических различий колоний S- и R-вариантов диссоциантов штаммов

В-2243D и В-9582 проводили с помощью бинокулярной лупы.

Для определения величины удельной нитрилазной активности различных форм диссоциантов отбирали бактериологической петлей одинаковые по морфологии колонии, суспендировали в фосфатном буфере, рН 7.6, и ставили реакцию трансформации с нитрилом акриловой кислоты.

Влияние плотности засева, способа, времени культивирования на продукцию нитрилазы в клеточной популяции штаммов В-2243D и В-9582 исследовали путем количественного определения удельной нитрилазной активности клеточной массы.

Для изучения способности штаммов В-2243D и В-9582 восстанавливать исходный уровень активности нитрилазы после хранения выращивали активные клоны 2 сут при  $30 \pm 1$  °С в пробирках на скошенной агаризованной среде «ГМ» и закладывали на хранение при  $5 \pm 2$  °С. В течение 60 сут хранения периодически высевали культуры на среду «ГМ» и после 4 сут культивирования при  $30 \pm 1$  °С определяли нитрилазную активность.

### Результаты и их обсуждение

Было проведено исследование влияния состава плотных питательных сред на характер роста и нитрилазную активность штаммов *A. denitrificans* VKM В-2243D и ВКПМ В-9582. С этой целью культуры выращивали в чашках Петри на различных питательных средах, изучали морфологию колоний, проводили оценку их ферментативной активности. Полученные результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1

Сравнение нитрилазной активности биомассы штаммов *Alcaligenes denitrificans* VKM В-2243D и ВКПМ В-9582 при культивировании на плотных питательных средах

Штамм	Удельная нитрилазная активность, ед/г						
	NB	LB	МПА	ТА	«А»	ГРМ	«Г»
В-2243D	$0.9 \pm 0.1$	$1.2 \pm 0.1$	$1.7 \pm 0.1$	$2.0 \pm 0.1$	$2.1 \pm 0.1$	$2.4 \pm 0.2$	$2.9 \pm 0.2$
В-9582	$1.4 \pm 0.1$	$1.8 \pm 0.1$	$2.5 \pm 0.2$	$3.0 \pm 0.2$	$3.1 \pm 0.2$	$3.6 \pm 0.2$	$4.3 \pm 0.2$

Максимальную нитрилазную активность штаммы проявляли при росте на среде «Г», минимальную – на агаризованной среде NB. При этом удельная нитрилазная активность штамма В-9582 на всех средах была выше, мутантный штамм обладал в среднем в 1.5 раза большей активностью нитрилазы по сравнению с диким штаммом В-2243D.

В ходе эксперимента выявлено, что при расसेве на плотных средах штаммы В-2243D и В-9582 образуют различные по морфологии типы колоний, которые можно условно разделить на S- (гладкие формы) и R- варианты (шероховатые формы). Морфологические типы колоний представлены на

рис. 1, 2. При пересевах изолированных колоний каждый вариант расщеплялся с образованием разных морфологических групп, характерных для данной плотной питательной среды. Причиной морфологической гетерогенности колоний исследуемых штаммов была диссоциация. На богатых питательных средах, содержащих пептон, триптон или дрожжевой экстракт, диссоцианты плохо различались по морфологии, в то время как на синтетической среде «Г» колонии можно было четко разделить по морфологии на гладкие и шероховатые. Таким образом, для разделения диссоциантов штаммов В-2243D и В-9582 целесообразно использовать синтетическую среду «Г».



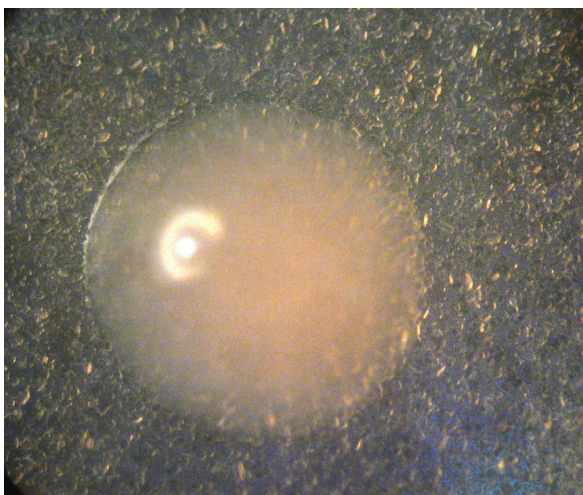


Рис. 1. Микрофотография колонии гладкой формы штамма *Alcaligenes denitrificans* ВКПМ В-9582 ( $\times 60$ )

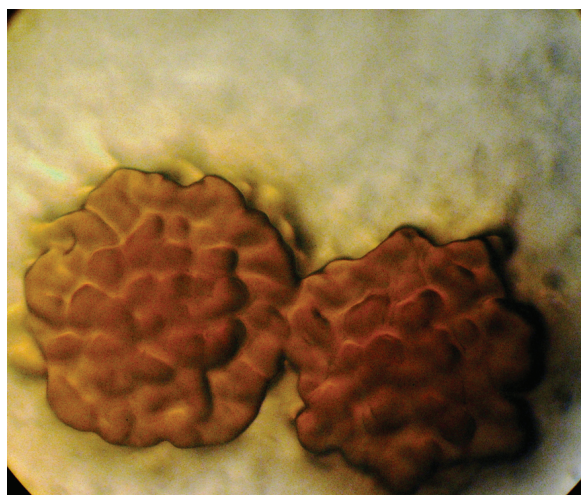


Рис. 2. Микрофотография двух колоний шероховатой формы штамма *Alcaligenes denitrificans* ВКПМ В-9582 ( $\times 60$ )

Для сравнения ферментативной активности *S*- и *R*-форм диссоциантов применяли разработанный нами экспресс-метод качественной оценки продукции нитриказы отдельных колоний микроорганизмов на плотных питательных средах.

Была установлена корреляция между морфологией колоний диссоциантов штаммов В-2243D и В-9582 и продукцией нитриказы в их клетках. Клоны, образующие колонии *S*-типа, как правило, обладали нитриказной активностью, в то время как большинство колоний *R*-типа были образованы клетками, у которых активность отсутствовала

или была ниже порога чувствительности метода. В дальнейшем при расewe отдельных изолятов исследуемых штаммов оба варианта диссоциантов расщеплялись как по морфологическим признакам, так и по наличию нитриказной активности.

Результаты исследования количественных показателей нитриказной активности *S*- и *R*-вариантов штаммов В-2243D и В-9582 представлены в табл. 2. Для культивирования использовали питательные среды, на которых исследуемые штаммы проявляли высокую активность нитриказы

Таблица 2

**Вариабельность величины удельной нитриказной активности клеток диссоциантов штаммов *Alcaligenes denitrificans* VKM В-2243D и ВКПМ В-9582 при культивировании на плотных питательных средах**

Среда	Штамм	Вариант диссоцианта	Нитриказная активность, ед/г			CV, %
			С $\bar{A}$	MaxCA	MinCA	
«Г»	В-2243D	<i>S</i>	3.7 $\pm$ 0.48	4.2	2.4	13.0
		<i>R</i>	0.7 $\pm$ 0.31	1.2	0.1	44.3
	В-9582	<i>S</i>	5.5 $\pm$ 0.74	6.3	3.5	13.5
		<i>R</i>	1.0 $\pm$ 0.46	1.7	0.2	46.2
«А»	В-2243D	<i>S</i>	2.8 $\pm$ 0.45	3.3	1.8	16.1
		<i>R</i>	0.8 $\pm$ 0.36	1.3	0.1	45.0
	В-9582	<i>S</i>	4.0 $\pm$ 0.71	4.8	2.6	17.8
		<i>R</i>	1.2 $\pm$ 0.56	1.9	0.2	46.9
ГРМ	В-2243D	<i>S</i>	2.7 $\pm$ 1.00	4.0	1.0	37.0
		<i>R</i>	1.4 $\pm$ 0.97	2.8	0	69.3
	В-9582	<i>S</i>	4.0 $\pm$ 1.61	5.6	1.4	40.3
		<i>R</i>	2.0 $\pm$ 1.35	3.8	0.2	67.5

Примечание. С $\bar{A}$  – среднее значение удельной нитриказной активности клеток, MaxCA – максимальное значение удельной нитриказной активности клеток, MinCA – минимальное значение удельной нитриказной активности клеток, CV – коэффициент вариаций ( $\sigma / \text{С}\bar{A} \times 100\%$ ),  $\sigma$  – стандартное отклонение, *S* – гладкие колонии, *R* – шероховатые колонии.

Из данных, представленных в табл. 2, видно, что у мутантного штамма В-9582 вариабельность значений нитриказной активности *S*-диссоциантов, образующих гладкие колонии, была больше по сравнению со штаммом В-2243D.

Клетки *R*-вариантов, взятые из шероховатых колоний, имели низкую активность нитриказы и отличались более высокой лабильностью ее величины. Значения активности *R*-диссоциантов штамма В-9582 больше варьировали на синтети-



ческих средах, а на среде ГРМ варибельность была меньше, чем у дикого штамма В-2243D. Тем не менее, на синтетических средах «Г» и «А» расщепление диссоциантов по количественному показателю продукции нитриказы было значительно ниже, чем на универсальной богатой питательной среде ГРМ. Развитие активных клонов обеспечивала среда «Г» при культивировании S-вариантов диссоциантов, как и в предыдущих экспериментах на этой среде изоляты штаммов В-2243D и В-9582 проявляли максимальную активность.

Далее была проведена оптимизация состава среды «Г». В результате чего создана плотная селективная синтетическая питательная среда «ГМ», на которой диссоцианты штаммов В-2243D и ВКПМ В-9582 давали морфологически хорошо

различимые колонии. У S-диссоциантов они отличались по профилю колонии и ее краю; в основном стабильно встречались колонии с каплеобразным, конусовидным и выпуклым профилем, с ровным и неровным краем. У R-диссоциантов колонии различались по форме, профилю и краю; преобладали складчатые, выпуклые колонии с ровным или неровным краем, значительно реже наблюдали появление колоний неправильной формы с уплощенным профилем и неровным краем. Размеры колоний варьировали от 1 до 5 мм.

Количественные показатели нитриказной активности клеток из основных морфологических типов колоний диссоциантов штаммов В-2243D и В-9582 на селективной среде «ГМ» представлены в табл. 3.

Таблица 3

**Сравнение удельной нитриказной активности клеток штаммов *Alcaligenes denitrificans* VKM В-2243D и ВКПМ В-9582 из колоний разных морфологических типов**

Вариант диссоцианта	Морфологический тип колоний	Штамм	СА, ед/г
S	Гладкая, круглая, блестящая, с каплеобразным профилем и ровным краем	В-2243D	7.04 ± 1.52
		В-9582	9.69 ± 1.40
	Гладкая, круглая, блестящая, с конусовидным профилем и ровным краем	В-2243D	2.84 ± 1.66
		В-9582	3.88 ± 2.14
	Гладкая, круглая, блестящая, с выпуклым профилем и неровным краем	В-2243D	2.28 ± 1.05
		В-9582	3.32 ± 1.30
R	Шероховатая, складчатая, матовая, с выпуклым профилем и ровным краем	В-2243D	0.34 ± 0.26
		В-9582	0.49 ± 0.36
	Шероховатая, неправильной формы, матовая, с уплощенным профилем и неровным краем	В-2243D	0.18 ± 0.15
		В-9582	0.25 ± 0.20

Примечание. СА – удельная нитриказная активность клеток.

Как видно из данных, представленных в табл. 3, гладкие, круглые, блестящие, с каплеобразным профилем и ровным краем колонии, выросшие на плотной синтетической селективной среде «ГМ», были образованы клетками, которые наиболее интенсивно продуцировали нитриказу. Клетки из шероховатых, матовых колоний обладали самой низкой активностью фермента или не проявляли ее совсем. Следует отметить, что максимальная удельная нитриказная активность биомассы из некоторых гладких колоний для штаммов В-2243D и В-9582 составляла 10.5 и 11.8 ед/г соответственно. Дальнейший пересев колоний с такой морфологией обеспечивал рост клеток, обладающих высокой активностью нитриказы.

В процессе исследований изучено влияние плотности засева, способа и времени культивирования на активность клеточной популяции, полученной из отдельных клонов штаммов В-2243D и В-9582. Было установлено, что при плотности засева 10–100 КОЕ/см<sup>2</sup> наблюдалась самая высокая нитриказная активность, при снижении или увеличении плотности засева активность клеток снижалась. Независимо от метода посева самая

высокая активность культур проявлялась на четвертые сут роста, после чего начинала постепенно снижаться.

При пассажах культур В-2243D и В-9582 на скошенный «ГМ» агар удельная нитриказная активность штаммов снижалась более чем в два раза по сравнению с исходными значениями, полученными при культивировании на чашках, 3.9 и 4.2 ед/г против 8.7 и 9.1 ед/г соответственно. Максимальная активность фермента при культивировании на скошенном агаре проявлялась на вторые сутки роста. Тем не менее, после первого пассажа с чашки на скошенный агар штаммы полностью восстанавливали исходный уровень нитриказной активности при последующем расसेве на чашки. С увеличением количества пересевов величина средней удельной нитриказной активности клонов падала.

Установлено, что в процессе хранения при пониженной температуре активность штаммов В-2243D и В-9582 оставалась стабильной только в течение 7 сут, после чего снижалась, однако всего 2–4 пассажа позволяли восстановить ее исходный уровень даже после 60 сут хранения.



Проведенные исследования подтвердили описанное в литературе явление диссоциации у бактерий, взаимосвязь между величиной ферментативной продукции клеток и морфологическими особенностями колоний диссоциантов [14]. Нами впервые было показано, что промышленные штаммы, относящиеся к виду *Alcaligenes denitrificans*, при культивировании на оригинальных плотных синтетических средах имели *S*- и *R*-варианты колоний с различной продукцией нитриказы. Гладкие, круглые, блестящие, с каплеобразным профилем и ровным краем колонии штаммов В-2243D и В-9582 образованы клетками с высокой активностью нитриказы. Клетки из шероховатых, неправильной формы, матовых, с уплощенным профилем и неровным краем колонии имели крайне низкую нитриказную активность.

Разработан экспресс-метод качественного определения нитриказной активности отдельных колоний микроорганизмов на плотных питательных средах. Такой подход к оценке различных изолятов позволил существенно увеличить выборку колоний и одновременно сократить время выделения активных клонов. Данная методика является оригинальной, в литературе аналоги не описаны.

Каждый промышленный штамм для проявления максимальной активности целевого фермента требует индивидуального подбора среды, условий культивирования и поддержания посевного материала. Известные продуценты нитриказы при оптимальных условиях роста имеют следующие величины нитриказной активности: у штамма *Rhodococcus rhodochrous J-1* максимальная удельная активность составляет 3.5 ед/г (212.4 ммоль/г\*ч при 20 °С) [5, 17], у штаммов *Rhodococcus rhodochrous NCIMB 40757* и *Rhodococcus rhodochrous NCIMB 40833* не более 1.4 ед/г (83.0 ммоль/г\*ч при 30 °С) [4, 18–21], *Alcaligenes sp. AK866N* – 8.4 ед/г (506.0 ммоль/г\*ч при 30 °С) [22], *Alcaligenes sp. В-6706* – 3.9 ед/г (234 ммоль/г\*ч при 30 °С) [11]. Нам в результате проведенной работы удалось выделить *S* – диссоцианты штаммов В-2243D и В-9582, которые на оригинальной селективной синтетической питательной среде «ГМ» при 20 °С стабильно проявляли удельную нитриказную активность 8.7 ед/г и 9.1 ед/г соответственно. Эти цифры не только превышают в 2–3 раза начальную активность штаммов, взятых нами в работу, но и превосходят показатели активности известных продуцентов нитриказ, описанных в литературе.

### Список литературы

1. Безбородов А. М., Загустина Н. А., Попов В. О. Ферментативные процессы в биотехнологии. М. : Наука, 2008. 335 с.
2. Пат. 2177034 RU, С 1 7 С 12 N1/20,9/78/(С 12 N 9/78, С 12 R 1:05). Штамм бактерий *Alcaligenes denitrificans* – продуцент нитриказы / Полтавская С. В., Козулина Т. Н., Сингирцев И. Н., Козулин С. В., Воронин С. П.
3. Пат. 2337954RU, С 1 С12N 1/20 С12R 1/05. Штамм бактерий *Alcaligenes denitrificans* – продуцент нитриказы / Козулин С. В., Воронин С. П., Глинский С. А., Козулина Т. Н., Леонова Т. Е., Новиков А. Д., Полтавская С. В., Рябченко Л. Е., Сингирцев И. Н., Яненко А. С.
4. Pat. 5998180 US. Nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* for converting acrylonitrile directly to acrylic acid / Armitage Y. Ch., Hughes J., Webster N. A.
5. Nagasawa T., Nakamura T., Yamada H.  $\epsilon$ -Caprolactam, a new powerful inducer for the formation of *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase // Arh. Microbiol. 1990. Vol. 155. P. 13–17.
6. Nagasawa T., Nakamura T., Yamada H. Production of acrylic and methacrylic acid using *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1990. Vol. 34. P. 322–324.
7. Kobayashi M., Yanaka N., Nagasawa T., Yamada H. Hyperinduction of an alifatic nitrilase by *Rhodococcus rhodochrous* K 22 // FEMS Microbiol. Lett. 1991. Vol. 77, № 1. P. 121–124.
8. Nagasawa T., Mauger J., Yamada H. A novel nitrilase, arylacetone nitrilase, of *Alcaligenes faecalis* JM3. Purification and characterization // Eur. J. Biochem. 1990. Vol. 194, № 3. P. 765–772.
9. Пат. 61-43037 JP. Способ получения акриловой (мет), акриловой кислоты / Watanabe I.
10. Забазная Е. В., Козулин С. В., Воронин С. П. Отбор штаммов, трансформирующих акрилонитрил и акриламид в акриловую кислоту // Прикладная биохимия и микробиология. 1998. Т. 34, № 4. С. 377–381.
11. Пат. 2081169 RU, С 1 МКИ<sup>6</sup> С12 N 9/78, С12 P7/40, 13/02, С12 R 1:05. Штамм бактерий *Alcaligenes species* – продуцент нитриказы / Забазная Е. В., Козулин С. В., Куликова Л. К., Воронин С. П.
12. Zheng Y.-G., Chen J., Liu Z.-Q. Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis* ZJB-063, a versatile nitrile-converting bacterium // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 77. P. 985–993.
13. Полтавская С. В. Биокаталитическое получение акрилата аммония : дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 2005. 135 с.
14. Милько Е. С., Котова И. Б., Нетрусов А. И. Процесс диссоциации у бактерий : учеб. пособие. М. : МАКС Пресс, 2007. 68 с.
15. Определитель бактерий Берджи : в 2 т. Т. 1 / пер. с англ. ; под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита. М. : Мир, 1997. 432 с.
16. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии. 6-е изд. перераб. и доп. М. : Химия, 1989. 448 с.
17. Пат. 5135858 US, Int.Cl.<sup>5</sup> С12 P13/04, С12 P17/00, С12 P13/00, С12 R1/01. Process for biological production of organic acids / Yamada H., Nagasawa T., Nakamura T.
18. Пат. 2188864 RU, МПК<sup>7</sup> С12 N9/78, С12 N1/20, С12 P13/02, С12 R1:01) Нитриказа, штамм *Rhodococcus rhodochrous* – продуцент нитриказы (варианты), способ получения акрилата аммония, способ детек-





- тирования нитрила, способ очистки полимера / Арм-тэйдж И. К. Хьюс Д., Вебстер Н. Э.
19. Pat. 6162624 US, Int.Cl C12 P007/40. Production of ammonium acrylate /Symes K. Ch., Hughes J.
20. Pat. 6361981 US, Int.Cl<sup>6</sup> C12 P007/62. Production of ammonium acrylate /Symes K. Ch., Hughes J.

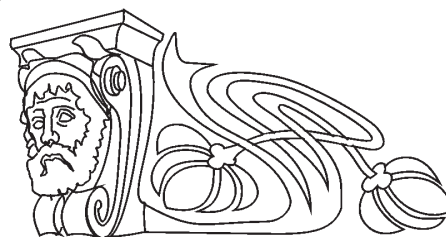
21. Пат. 2182928 RU, МПК<sup>7</sup> C12 P7/40, C12 R1:01. Способ получения водного раствора (мет)акриловой кислоты или ее соли / Саймс К. Ч., Хьюс Д.
22. Pat. 1-132392 JP, Int. Cl<sup>4</sup> C12p 7/40, C12 R1:05. Microbiological production of monocarboxylic acid / Kawakami K., Tanabe T., Inoue Sh.

УДК 636.087.7/8:636.5.084

## ВЛИЯНИЕ НОВОГО КОМБИНИРОВАННОГО СИНБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА МИКРОБОЦЕНОЗ КИШЕЧНИКА ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

Е. С. Красникова, В. В. Ситников, О. Н. Фомичева,  
А. А. Щербаков, А. В. Красников

Саратовский государственный аграрный университет  
E-mail: krasnikova\_es@mail.ru



Выяснено влияние разработанного авторами препарата-синбиотика на микроценоз кишечника цыплят-бройлеров. Показано, что препарат стимулирует развитие лактобацилл и энтерококков в толстом кишечнике. Определено, что применение препарата-синбиотика более эффективно, чем введение в рацион пробиотика и пребиотика в отдельности. Доказано, что синбиотик обладает антагонистическим действием против энтеропатогенных штаммов *Escherichia coli* 01 и *Salmonella pullorum* P, значительно облегчает течение сальмонеллеза и колибактериоза и может использоваться как вспомогательный элемент при лечении данной инфекции.

**Ключевые слова:** цыплята-бройлеры, препарат-синбиотик, пробиотики, пребиотики, *Salmonella pullorum*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, антагонизм.

### Influence of the New Combined Sinbiotic Preparation on Ntestinal Microbial of Chickens-Broilers

E. S. Krasnikova, V. V. Sitnikov, O. N. Fomicheva,  
A. A. Scherbakov, A. V. Krasnikov

Influence of the sinbiotik, developed by the authors, on ntestinal microbial of chickens-broilers is found out. It is shown that the preparation stimulates the development of lactobacilli and enterococci in the colon. It is determined that use of the synbiotics more effective than the introduction into the diet of probiotic and prebiotic separately. It is proved that synbiotics have antagonistic activity against enteropathogenic strains of *Escherichia coli* 01 and *Salmonella pullorum* P, much easier for salmonellosis and colibacillosis and can be used as a supporting element in the treatment of this infection.

**Key words:** chicken-broilers, synbiotics preparation, probiotics, prebiotics, *Salmonella pullorum*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, antagonism.

Существенная роль кишечной микрофлоры в процессе пищеварения и формирования гомеостаза является научно доказанным фактом. Поэтому препараты, содержащие представителей

нормальной микрофлоры кишечника (пробиотики), или вещества, стимулирующие развитие нормофлоры (пребиотики), широко применяются для профилактики и лечения многих болезней как в комплексе с препаратами других механизмов действия, так и отдельно [1, 2]

Часто причиной возникновения кишечных инфекций являются условно патогенные микроорганизмы (сальмонеллы, кампилобактеры, кишечные палочки и др.) [3]. Формированию нормального кишечного микроценоза способствуют пробиотические добавки и препараты, в состав которых входят живые бактерии из числа основных ее представителей, такие как лактобациллы и энтерококки. Кроме того, следствием деятельности нормальной микрофлоры кишечника является продукция всех витаминов группы В и витамина К, а также образование кислот, ингибирующих развитие гнилостных процессов [4, 5, 2].

Кроме пробиотиков одним из регуляторов пищеварительной системы являются пребиотики и среди них полисахариды, относящиеся к классу β-гликанов, веществ, не гидролизующих собственными пищеварительными ферментами организма и являющихся промоторами нормальной микрофлоры кишечника. Особого внимания заслуживает инулин, так как этот пребиотик в достаточном количестве содержится в клубнях и корнях растений (топинамбур, цикорий, чеснок и др.) и, следовательно, его получение не требует больших экономических затрат. Известно, что инулин влияет на обмен веществ, способствует усвоению витаминов и минералов в организме (особенно Са, Mg, Zn, Cu, Fe и P), укрепляет иммунную систему организма [6, 7].