N E W S
OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL
ISSN 2224-5308
Volume 1, Number 313 (2016), 147 – 152

STUDY OF MICROBIAL ENZYMES BY USE OF EXTRACT OF BEER PELLET AS A RAU MATERIAL

D. Taskynbaeva, B. J. Mutaliyeva, R. E. Aytkulova, D. E. Kudasova, J. R. Elemanova

M.Auezov SKSU, Shymkent, Kazakhstan.
E-mail: Dariha_uko@ mail.ru

Keywords: enzymes, microorganisms, amylolytic activity, deep cultivation, beer pellet.

Abstract. This paper presents the results of research of amylolytic, proteolytic and hydrolytic activity of the Bacillus subtilis selected strains at deep cultivation.

Separated Bacillus subtilis strains were tested for the ability to hydrolyze vegetable polymeric carbohydrates as a source of which the beer pellet has been used. By the research results were established that the most optimal pH for proteolytic and amylolytic activity is 9 at concentrations of 1.15 and 0.8 mg / ml / sec respectively. Furthermore, it was determined that the optimal temperature is 50^0C.

Also the results of determination of the hydrolytic activity of the supernatant obtained from cultures of isolated strains were showed, at cultivation on a culture of the prepared medium. As a substrate for the determination of total hydrolytic activity are used the extract of beer pellet. The maximum values of the activity were observed on the 2nd day of cultivation; at continuation of cultivation the activity values of both strains reaches a plateau and declines slowly. It is also established that the submerged cultivation using beer pellets extract nearly twice enhances the hydrolytic activity of a produced strain in comparison, if as a substrate are used starch.

УДК 664.162.116

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ СЫРЬЯ ЭКСТРАКТА ПИВНОЙ ДРОБИНЫ

Д. Таскынбаева, Б. Ж. Муталиева, Р. Э. Айткулова, Д. Е. Кудасова, Ж. Р. Елеманова

ЮКГУ им. М. Ауэзова, Шымкент, Казахстан

Ключевые слова: ферменты, микроорганизмы, амилолитическая активность, глубинное культивирования, пивная дробина.

Аннотация. В работе представлены результаты по исследованию амилолитической, протеолитической и гидролитической активности выделенного штамма Bacillus subtilis при глубинном культивировании.

Выделенные штаммы Bacillus subtilis были исследованы на способность гидролизовать растительные полимерные углеводы, в качестве источника которых была использована пивная дробина. Результатами исследований было установлено, что наиболее оптимальным pH для амилолитической и протеолитической активности является 9 при концентрациях 1,15 и 0,8 мг/мл/сек соответственно. Кроме того, опрделено, что наиболее оптимальной является температура 50^0С.

Кроме того, показаны результаты определения гидролитической активности надосадочной жидкости, полученной из культур выделенных штаммов, при культивировании на подготовленной питательной среде. В качестве субстрата для определения суммарной гидролитической активности использовали отвар пивной дробины. Максимальные значения активности наблюдались на 2-й день культивирования; при продолжении культивирования значения активности обоих штаммов выходили на плато и медленно снижались. Также установлено, что глубинное культивирование при использовании экстракта пивной дробины почти вдвое повышает уровень продуцируемой гидролитической активности штамма по-сравнению, если в качестве субстрата был использован крахмал.

Введение. Ферменты - это специфические катализаторы белковой природы. Они вырабатываются клетками и тканями организмов, и которые играют центральную роль в каждом биохимическом процессе. Они катализируют сотни ступенчатых реакций по разрушению питательных веществ, сохранению и трансформации химической энергии и получении биологических макромолекул из простых предшественников. Исследование ферментов имеет огромное практическое значение в связи с применением, которое основано на их высокой каталитической активности и более высокой по сравнению с небиологическими каталитическими системами субстратной специфичностью. Например, во многих заболеваниях, особенно связанных с наследуемыми генетическими нарушениями, что связано с дефицитом или полным отсутствием одного или более ферментов. Для других заболеваний, наоборот, избыточная активность ферментов также может быть причиной их появления. Исследование активности ферментов в плазме крови, эритроцитов, образцах тканей имеет диагностическое значение. Многие лекарства оказывают свой биологический эффект через взаимодействие с ферментами. Кроме того, ферменты являются важными практическими инструментами, не только в медицине, но и в химической и пищевой промышленности, сельском хозяйстве.

Микробные ферменты являются предпочтительными по-сравнению с ферментами животного и растительного происхождения в связи с более низкой себестоимостью для производства, и состав этих ферментов более предсказуемый, контролируемый и надежный [1]. Кроме того, их можно получить в достаточном количестве для применения в различных отраслях промышленности.

Сельскохозяйственные и отходы пищевой промышленности рассматриваются как лучшие субстраты для твердофазной ферментации, и использование твердофазной ферментации для производства ферментов не является исключением для этого. Ряд таких субстратов перерабатывается для культивирования микроорганизмов-продуцентов энзимов. Некоторые из используемых субстратов включают жом тростника, пшеничные, рисовые, кукурузные отруби, солома пшеницы, риса, рисовую шелуху и др. [2].

Целью данного исследования является получение ферментов из Bacillus subtilis, используя в качестве субстрата экстракт пивной дробины.

Пивная дробина богата пищевыми волокнами, что является одним из наиболее необходимых элементов здорового питания, так как они способствуют правильному пищеварению не только животных, но и человека. Ранее авторами [3] приведен аминокислотный состав сухой пивной дробины, где показано, что при анализе особое внимание уделяется содержанию незаменимых аминокислот, которые обусловливают биологическую ценность белков. Ими установлено, что наибольшее количество среди незаменимых аминокислот приходится на фенилаланин, тирозин, глутаминовую кислоту, пролин, а также лимитирующие аминокислоты, такие как лизин и треонин. Таким образом, химический анализ пивной дробины, а также анализ литературных данных позволил выбрать пивную дробину как сырье, которое достаточно богато питательными веществами и может быть применено в качестве субстрата для культивирования микроорганизмов – продуцентов ферментных препаратов. Таким образом, в задачи исследования входило использование пивной дробины в качестве основного компонента питания для микроорганизмов в получении ферментных препаратов.

Методы исследования. В работе проведен скрининг амилолитической активности B. Subtilis, где для его выявления использовали среду Лоурия-Бертони (LA), в который вносится 1%-ный раствор крахмала. После инкубирования микроорганизмов раствор Люголя был добавлен для идентификации окрашенной зоны. По наличию окрашивания и его диаметра, образованного после добавления раствора Люголя, устанавливают амилолитическую активность культуры [4,5].

Амилолитическая активность. Для выявления амилолитической активности использовали плотные питательные среды: MRS (Merck) - для лактобацилл и Лоурия-Бертони (LA) - для остальных бактерий, в которые вносили 1% водорастворимый картофельный крахмал. Исследуемые микроорганизмы высевали штрихом на чашки Петри и инкубировали при 37 о С в течение 2–5 суток. Гидролиз крахмала обнаруживали по бесцветным зонам вокруг штриха (колоний) после обработки агаровой пластинки раствором Люголя. Среда, содержащая крахмал, окрашивалась в синий цвет.

Состав питательной среды. В 1 литре дистиллированной воды растворяют 6 г. Бактериологического пептона, 0,5 г. $MgSO_4.7H_2O$, 0,5 г. KCL, 1 г. субстрата. Затем 100 мл среды в конической колбе подогревается на плитке и стерилизуется в автоклаве при 120^0С.

Определение протеолитической активности. Определение протеолитической активности проводили по гидролизу 1 % раствора казеина протеазами исследуемых штаммов. За единицу протеолитической активности принимали количество фермента, которое за 1 мин при 37°Си pH 7,2 повышает в неосаждаемых трихлоруксусной кислотой продуктах протеолиза содержание тирозина на 1 микроэквивалент или за 10 мин при той же температуре повышает оптическую плотность раствора при 280 нм на 1 единицу.

Исследование влияния pH на выход амилазы. Влияние pH было исследовано для значений pH от 6 до 9 для B. subtilis, выход амилазы исследован по методу ДНСК [6,7].

Определение редуцирующих сахаров по реакции с 3,5 – диннитросалициловой кислотой. При взаимодействии сахаров с 3, 5 – динитросалициловой кислотой последняя восстанавливается в 3-амино 5-нитросалициловую кислоту. В мерной колбе на 1 литр в дистиллированной воде растворяют 10 г. 3,5 динитросалициловой кислоты, 300 г. Сегнетовой соли, 16 г. Едкого натра и доводят до метки водой. Раствор выдерживают два дня в темном месте, затем фильтруют в склянку оранжевого цвета и хранят в темноте. К 1 мл испытуемого раствора приливают 2 мл динитросалицилового реактива, нагревают 5 мин. В кипящей водяной бане, охлаждают до комнатной температуры, доводят до объема 25 мл. Определение оптической плотности проводят при 530 нм (зеленый светофильтр).

Определение гидролитической активности. Гидролитическая активность определяется в надосадочной жидкости из культур, которую получают путем центрифугирования полного объема культуры. В реакционную смесь вводят 900 мл соответствующего полисахаридного субстрата и 100 мл надосадочной жидкости. Пробы по 50 мл отбирают в исходный момент и через каждые 30 мин в течение 1,5-3 ч. Для контроля к субстрату добавляют гомологичную надосадочную жидкость, прогретую в течение 10 мин при 80^0С. Реакцию останавливают нагреванием проб при 95^0С в

течение 10 мин. Определяют активность путем определения концентрации глюкозы, используя колориметрический метод. Для этого измеряют оптическую плотность на фотоколориметре при длине волны 490 нм, и по градуированному графику определяют концентрацию моносахарозы. Гидролитическую активность ферментов выделенной глюкозы за 1 мин (мкмоль/мин) рассчитывают на 100 мл надосадочной жидкости исследуемых штаммов.

В качестве полисахаридных субстратов используется водорастворимый крахмал, а также экстракт пивной дробины.

Результаты и обсуждение

В данной работе представлены результаты по исследованию амилолитической, протеолитической и гидролитической активности выделенного штамма Bacillussubtilis при глубинном культивировании.

Выделенные штаммы Bacillussubtilis были исследованы на способность гидролизовать растительные полимерные углеводы, в качестве источника которых была использована пивная дробина.

Рисунок 1 показывает влияние pH на активность ферментов, вырабатываемых B. subtilis. Было установлено, что наиболее оптимальным pH для амилолитической и протеолитической активности является 9 при концентрациях 1,15 и 0,8 мг/мл/сек соответственно.

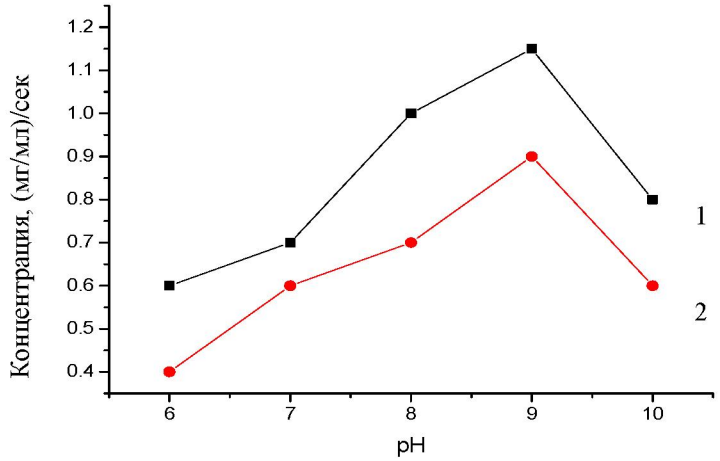

Рисунок 1 – Влияние pH на выход ферментов амилазы и протеазы, продуцируемых B.subtilis: 1 – амилаза; 2 – протеаза

Рисунок 2 показывает влияние температуры на ферментную активность B. subtilis. Оптимальной является температура 45- 50°C.

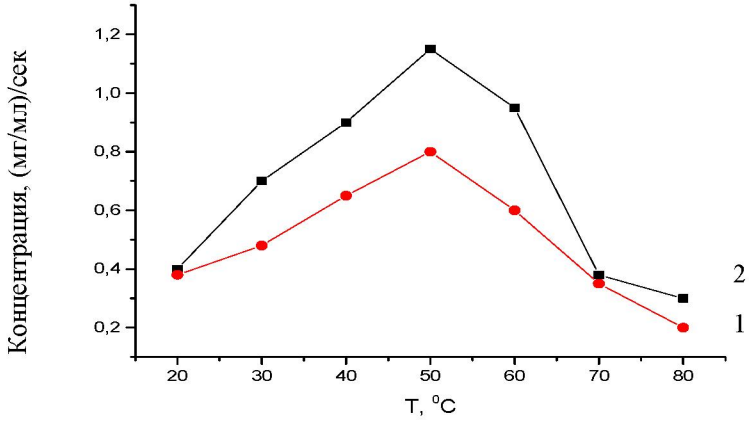

Рисунок 2 – Влияние температуры на ферменты амилаза и протеаза, продуцируемых B. Subtilis: 1 – амилаза; 2 – протеаза

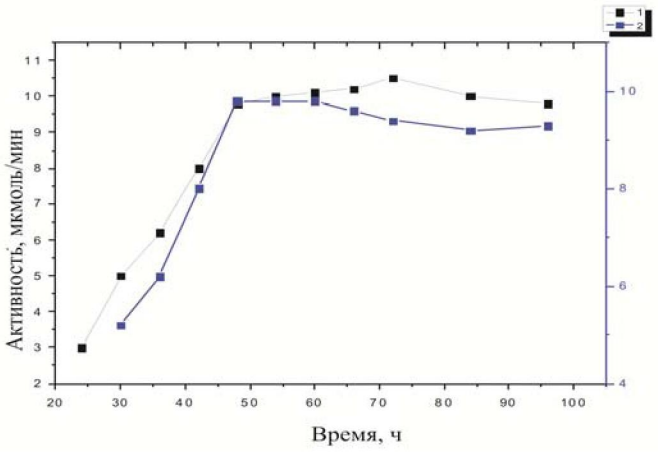

Рисунок 3 – Общая гидролитическая активность выделенного штамма при культивировании:
1 – глубинном и 2 – пленочном с использованием экстракта из пивной дробины

На рисунке 3 показаны результаты определения гидролитической активности надосадочной жидкости, полученной из культур выделенных штаммов, при культивировании на подготовленной питательной среде. В качестве субстрата для определения суммарной гидролитической активности использовали отвар пивной дробины. Видно, что при глубинном культивировании суммарные значения гидролитической активности штаммов практически одинаковы. Активность выражается в микромолях субстрата, превращенного за минуту одним мг фермента. Максимальные значения активности наблюдались на 2-й день культивирования; при продолжении культивирования значения активности обоих штаммов выходили на плато и медленно снижались. В сравнении с глубинными стационарные культуры имели более низкий уровень гидролитических ферментов: максимальный уровень суммарной гидролитической активности штамма наблюдался на 4-й день инкубации. Сравнение значений гидролитической активности пленочных и глубинных культур показывает, что более эффективным является глубинное культивирование.

Более замедленная динамика нарастания активности ферментов гидролаз при стационарном культивировании может объясняться дополнительным временем (10-15 ч), которое требуется для формирования пленки.

Помимо суммарной гидролитической активности с использованием в качестве субстрата отвара пивной дробины была определена гидролитическая активность надосадочной жидкости штаммов в отношении крахмала (таблица).

Активность внеклеточных гидролаз в глубинных и пленочных культурах штаммов

Штамм	Время культивирования	Скорость образования продуктов реакции (мкмоль/мин. при гидролизе различных субстратов)	
		крахмал	экстракт пивной дробины
Выделенный штамм	72 ч, глубинное	15,6	26,1

Выводы. Видно, что глубинное культивирование при использовании экстракта пивной дробины почти вдвое повышает уровень продуцируемой гидролитической активности штамма по-сравнению, если в качестве субстрата был использован крахмал.

Таким образом, проведенный анализ глубинных культур штаммов указывает на возможность использования глубинного культивирования для продукции ферментов амилолитического, протеолитического и гидролитического комплекса, который может гидролизовать крахмал и целлюлозу при использовании в качестве субстрата пивной дробины.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Babbitt P.C. GerltJ.A. Understanding enzyme superfamilies: chemistry as the fundamental determinant in the evolution of new catalytic activities. J. Biol. Chem. 27, 30, 1997.-591–30, 594.

[2] Lerner R.A., Benkovic S.J., Schulz P.G. At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies. Science. 1991.- 252, 659–667.

[3] Burhan A, Nisa U, Gokhan C., Ashabil A. and Osmair G. Enzymatic Properties of a novel thermostablether-mophilic alkaline and chelator resistant amylase from an al-kaphilic Bacillus spIsolate ANT-6. Process Biochemistry. (38): 2003. 1397–1403.

[4] Mitra P., Chakraverty R., Chandra A. L. Pro-duction of proteolytic enzyme in solid state fermentation system.Brazilian Journalof Science Research (55): 1994.-439–442

[5] Волотка Ф.Б., Богданов В.Д. Технологическая и химическая характеристика пивной дробины. Вестник ТГЭУ. №1.2013.-С.114-124.

[6] Бруслик Н.Л., Каюмов А.Р., Богачев М.И., Яруллина Д.Р. Сравнительная характеристика амилолитической активности грамположительных бактерий. Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация, 2014.- № 2. С. -47-51.

[7] Bertrand, T.F., Frederic, T. and Robert, N. Production and Partial Characterization of a thermostable amylase from Ascomycetes yeast strain isolated from starchy soil. McGraw-Hill Inc., New York. pp. 2004.-53-55.

[8] Шапкарин В.В., Королев А.П., Гридина С.Б., Зинкевич Е.П. Биохимия. Сборник лабораторных работ. Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. – Кемерово, 2005.-84 с.

REFERENCES

[1] Babbitt P.C. GerltJ.A. Understanding enzyme superfamilies: chemistry as the fundamental determinant in the evolution of new catalytic activities. J. Biol. Chem. 27, 30, 1997.-591–30, 594.

[2] Lerner R.A., Benkovic S.J., Schulz P.G. At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies. Science. 1991.- 252, 659–667.

[3] Burhan A, Nisa U, Gokhan C., Ashabil A. and Osmair G. Enzymatic Properties of a novel thermostablether-mophilic alkaline and chelator resistant amylase from an al-kaphilic Bacillus spIsolate ANT-6. Process Biochemistry. (38): 2003. 1397–1403.

[4] Mitra P., Chakraverty R., Chandra A. L. Pro-duction of proteolytic enzyme in solid state fermentation system.Brazilian Journalof Science Research (55): 1994.-439–442

[5] Volotka F.B., Bogdanov V.D. Tehnologicheskaja i himicheskaja harakteristika pivnoj drobiny. Vestnik TGJeU. №1.2013.-S.114-124.

[6] Bruslik N.L., Kajumov A.R., Bogachev M.I., Jarullina D.R. Sravnitel'naja harakteristika amiloliticheskoj aktivnosti grampolozhitel'nyh bakterij. Vestnik VGU, Serija: Himija. Biologija. Farmacija, 2014.- № 2. C. -47-51.

[7] Bertrand, T.F., Frederic, T. and Robert, N. Production and Partial Characterization of a thermostable amylase from Ascomycetes yeast strain isolated from starchy soil. McGraw-Hill Inc., New York. pp. 2004.-53-55.

[8] Shapkarin V.V., Korolev A.P., Gridina S.B., Zinkevich E.P. Biohimija. Sbornik laboratornyh rabot. Kemerovskij tehnologicheskij institut pishhevoj promyshlennosti. – Kemerovo, 2005.-84 s.

СЫРА ҮГІНДІСІНІҢ ТҰНДЫРМАСЫН ШИКІЗАТ РЕТІНДЕ ҚОЛДАНЫП МИКРОАҒЗАЛАРДЫҢ ФЕРМЕНТТЕРІН ЗЕРТТЕУ

Д. Таскынбаева, Б. Ж. Муталиева, Р. Э. Айткулова, Д. Е. Кудасова, Ж. Р. Елеманова

М. Әуезов атындаєы ОҚМУ, Шымкент, Казахстан

Тірек сөздер: ферменттер, микроағзалар, амилолитикалық белсенділік, түптік культивирлеу, сыра бөліндісі.

Мақалада сыра бөліндісінің тұндырмасын субстрат ретінде қолданып микроағзалар ферменттерін алу зерттеулері келтірілген. Талдау жасау көрсеткендей, штаммдардың амилолитикалық, протеолитикалық, гидролитикалық кешеннің фермент өнімдерін алу үшін түптік культивирлеуде крахмал мен целлюлозаны гидролиздеу кезінде субстрат ретінде сыра үгінділерін қолдану тиімді болады. Зерттеу нәтижелерінде анықталғандай, амилолитикалық және протеолитикалық белсенділік үшін 1,15 және 0,8 мг/мл/сек концентрацияларға сәйкес оптималды pH 9 болып табылады. Одан басқа, оптималды температура ретінде 50^0C қолданылды,

Сонымен қатар, дайындалған қоректік орталарда культивирлеу кезінде бөлінген штаммдар культурасынан алынған тұнба үстіндегі сұйықтықтың гидролитикалық белсенділігі анықталды. Гидролитикалық белсенділіктің қосындысын анықтау үшін субстрат ретінде сыра үгіндісінің тұндырмасы қолданылды. Белсенділіктің максималды мәндері культиврлеудің екінші күні байқалды, культивирлеуді жалғастыру кезінде екі штаммдардың белсенділік мәндері платода көрсетілді және баяу төмендеді. Анықталғандай, сыра үгіндісінің тұндырмасын қолданып түптік культивирлеу кезінде крахмалды субстрат ретінде қолданумен салыстырғанда штаммдардың продуцирленетін гидролитикалық белсенділік деңгейін екі есеге арттырады.

Поступила 02.02.2016 г.