

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 1, Number 313 (2016), 135 – 139

**STUDY OF CONDITIONS OF CULTIVATION AND ENZYMATIC
ACTIVITY OF *Bacillus subtilis* MICROORGANISMS
AS SOURCE OF BIOLOGICALLY-ACTIVE SUBSTANCES**

D. Taskynbayeva, B. Zh. Mutaliyeva, R. E. Aitkulova, D. E. Kudasova, A. D. Dauylbai

M. Auezov SKSU, Shymkent, Kazakhstan.

E-mail: Dariha_uko@mail.ru

Key words: *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, cultivation, enzymatic activity, biologically-active substances.

Abstract. In this paper the hydrolytic activity of film and depth cultures of strains was studied. Results showed the possibility of usage of depth cultivation for producing of hydrolytic complexes enzymes, hydrolyzing starch. The optimal conditions of cultivation of obtained microorganisms strains were determined, also the possibility of usage the beer pellet as a substrate, because it contains nutrient substances and amino acids, necessary for microorganisms growth. It is established that at cultivation on a nutrient medium containing brewer's grain, an intensive growth and accumulation of the protein and complex of hydrolytic enzymes are taken place, the most appropriate and optimal for many reasons is the submerged cultivation of the isolated strain. It is seen that at deep cultivation the summary values of hydrolytic activity of strains are practically identical. Usage of deep cultivation allows double increase the final production of enzymes and use more concentrated coarser medium without prior saccharification. Stationary culture had lower levels of hydrolytic enzymes with comparison with deep cultures, due to additional time required for film formation.

It is also shown that the optimal pH range is 6.5-8.0, and also the continuous aeration of the medium.

УДК 612.395

**ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И
ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ
МИКРООРГАНИЗМОВ *Bacillus subtilis* КАК ИСТОЧНИКА
БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

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

ЮКГУ им. М. Аузова, Шымкент, Казахстан

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, культивирования, ферментативная активность, биологический активные вещества.

Аннотация. В статье исследована гидролитическая активность пленочных и глубинных культур штаммов. Они показывают возможность использования глубинного культивирования для продукции ферментов гидролитического комплекса, гидролизующих крахмал. Определены оптимальные условия культивирования выделенных штаммов микроорганизмов, а также возможность использования в качестве субстрата пивной дробины, так как он богат питательными веществами и аминокислотами, необходимыми для роста микроорганизмов. Установлено, что при культивировании на питательной среде, содержащей пивную дробину, происходит интенсивный рост, накопление белка и комплекса гидролитических ферментов, при этом наиболее подходящим и оптимальным является по многим причинам глубинное культивирование данного выделенного штамма. Видно, что при глубинном культивировании суммарные значения гидролитической активности штаммов практически одинаковы. Применение глубинного дает возможность вдвое повысить

конечную выработку ферментов и использовать более концентрированные крупнодисперсные среды без их предварительного осахаривания. Стационарные культуры имели более низкий уровень гидролитических ферментов по-сравнению с глубинными, что по-видимому связано с дополнительным временем, необходимым для формирования пленки.

Также показано, что наиболее оптимальными являются пределы pH 6,5-8,0, а также непрерывная аэрация среды.

Введение. Микроорганизмы такие как *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* являются очень важными для промышленного производства ферментов, биологически активных веществ (БАВ), антибиотиков, гормональных препаратов. Это связано с разнообразием метаболических процессов. Они способны синтезировать и выделять большое количество экстраклеточных белков и других веществ, находящих применение в различных областях медицины и сельского хозяйства.

Штаммы микроорганизмов *Bacillus subtilis* имеют очень большие потенциальные возможности в прикладном аспекте, который включает их применение как пробиотиков, и агентов против патогенной микрофлоры в животноводстве и защите растений, а также производства ферментных препаратов. Немало работ посвящено значению морфологических и физиологических исследований промышленно-важных микроорганизмов. Это влияет на перемешивание, массоперенос и аэрацию в биореакторе. Кроме того, микро-морфология также может влиять на метаболитную продуктивность. В некоторых работах приводятся данные по росту исследуемых микроорганизмов на различных средах, а также влиянию различных факторов.

Методы исследований. Таким образом, для создания лекарственных препаратов на основе микроорганизмов, выделенных из регионов Южно-Казахстанской области. Первостепенное значение имеет исследование условий культивирования (pH, концентрация растворенного кислорода, состав питательной среды, способы культивирования), а также определение ферментативной активности выделенных штаммов микроорганизмов.

Штаммы *Bacillus Subtilis* были выделены из такого материала сена, который является доступным, по методике, описанной в работе, который включает приготовление питательной среды, выделение чистой культуры, культивирование выделенных микроорганизмов на питательных средах, содержащих мясо-пептонный агар [1].

Для культивирования штамма *Bacillus subtilis* применяют простые и сложные питательные среды. Культивирование проводят при 28-30°C в течение 24-36 часов до достижения плотности культуры (титра клеток) 10^{10} - 10^{11} клеток на мл.

Культивирование [2] было проведено глубинным и стационарным способом, с образованием бактерий во взвешенном состоянии и в виде пленки соответственно.

Гидролитическая активность определяется в надосадочной жидкости из культур, которую получают путем центрифугирования полного объема культуры [3]. 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°C. Реакцию останавливают нагреванием проб при 95°C в течение 10 мин. Определяют активность путем определения концентрации глюкозы, используя колориметрический метод и группой химических реакций, основанных на способности сахаров (глюкозы) отнимать от ряда соединений кислород [4]. Для определения концентрации глюкозы по колориметрическому методу 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 [5]. Восстановывающие свойства глюкозы были использованы при определении *реакцией с щелочным раствором сернокислой меди — реакцией Фелинга* и *реакцией с щелочным раствором висмута — реакцией Ниландера*.

В качестве полисахаридных субстратов используется водорастворимый крахмал, экстракти мелассы, пивной дробины, а также глюкоза, сахароза [6].

Клетки выделенного из сена штамма *Bacillus subtilis* пересевают на агаризованную среду, помещают в термостат при 28°C. После 24-30 часов инкубации подросшие клетки смывают фосфатным буфером (pH 7,2) или физраствором, переносят в колбы с питательной средой и

проводят культивирование при 30°C с аэрацией при перемешивании в течение 24 часов [7,8]. Полученную биомассу центрифугируют и сусpendingируют в этом же буфере до достижения определенной плотности супензии.

В работе представлены результаты по исследованию гидролитической активности выделенного штамма *Bacillus subtilis* при глубинном и пленочном культивировании.

Выделенные штаммы *Bacillus subtilis* были исследованы на способность гидролизовать растительные полимерные углеводы, в качестве источника которых были использованы экстракты мелассы, пивной дробины.

Результаты и их обсуждение

На рисунках 1, 2 показаны результаты определения гидролитической активности надосадочной жидкости, полученной из пленочных культур выделенных штаммов, при стационарном 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. Однако увеличение периода функциональной активности пленочных культур штаммов позволяла в итоге немного увеличить общую гидролитическую активность выделенного штамма.

Максимальный уровень синтеза гидролитических ферментов штаммами при стационарном культивировании был, достигнут путем увеличения объема посевного материала до 10% и использования в качестве инокулюма культуральной жидкости 48-часовых глубинных культур. Данный способ позволяет сократить время культивирования.

Помимо влияния состава питательной среды на рост микроорганизмов *B. subtilis* были исследованы также такие параметры как pH, доступ растворенного кислорода при глубинном культивировании. Результаты исследований показали, что наиболее оптимальными являются pH среды в пределах от 6,5-8,0, а также непрерывная аэрация среды.

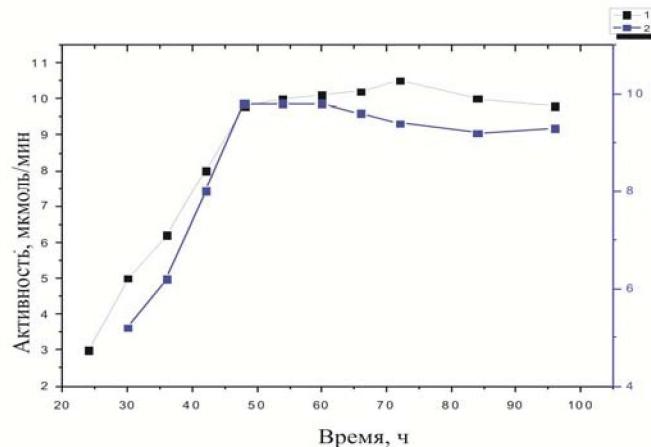


Рисунок 1 – Общая гидролитическая активность выделенного штамма при культивировании:
1 – глубинном и 2 – пленочном с использованием экстракта из пивной дробины

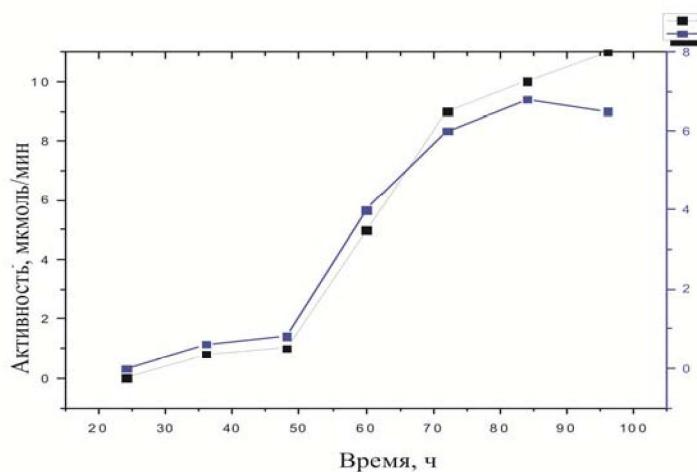


Рисунок 2 – Общая гидролитическая активность выделенного штамма при культивировании:
1 – пленочном и 2 – глубинном с использованием раствора крахмала

Таким образом, были определены оптимальные условия культивирования выделенных штаммов микроорганизмов, а также возможность использования глубинного культивирования для продукции ферментов гидролитического комплекса, который может гидролизовать крахмал при использовании в качестве субстрата пивной дробины, так как он богат питательными веществами и аминокислотами, необходимыми для роста микроорганизмов.

Выводы:

1. Получена чистая культура микроорганизмов *Bacillus subtilis* из сены, установлено, что при культивировании на питательной среде, содержащей пивную дробину, происходит интенсивный рост, накопление комплекса гидролитических ферментов, при этом наиболее подходящим и оптимальным является по многим причинам глубинное культивирование данного выделенного штамма. Проведенный анализ гидролитической активности пленочных и глубинных культур штаммов указывает на возможность использования глубинного культивирования для продукции ферментов гидролитического комплекса: гидролизующих крахмал, что позволяет применять штамм *Bacillus subtilis* для переработки различных источников углеводов, таких как экстракти пивной дробины, мелассы и т.д.

2. Применение глубинного культивирования дает возможность вдвое повысить конечную выработку ферментов и использовать более концентрированные крупнодисперсные среды без их предварительного осахаривания.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Подберезный В.В., Полянцев Н.И., Ропаева Л.В. Культивирование производственных штаммов *Bacillus subtilis* в подсырной сыворотке // Ветеринария.- 1996.-N 1.-С. 21-29.
- [2] Бойко Н.В., Лисецька М.В. Разработка пробиотиков виб 1рковоцн: Протисклеромна эффективность разных штаммов *B. subtilis* // Наук. вюн. Ужгор. ун-ту. Сер. Бiol. 1997. - N 4. - С. 194-198.
- [3] Кудрявцев В.А., Сафонова Л.А., Осадчая А.И. и др. Влияние живых культур *Bacillus subtilis* на неспецифическую резистентность организма // Микробиология. Т.58, N 2. 1996 - С. 46-53.
- [4] Кузнецова Н.И., Смирнова Т.А., Шамшина Т.Н. и др. Штамм *Bacillus thuringiensis*, токсичный для комнатной мухи // Биотехнология. 1995. -N3-4.-С. 11-14.
- [5] Митрохин С.Д., Шендеров Б.А. Микробиологические и биохимические показатели изменения микробной экологии толстой кишки крыс под влиянием рифампицина. Антибиотики и химиотерапия – 1999.- Т. 34 № 6 (482-4).
- [6] Биохимия. Сб. лаб. работ. В.В. Шапкарин, А.П. Королев, С.Б. Гридин, Е.П. Зинкевич. Кемеровский техногический институт пищевой промышленности. – Кемерово, 2005.-84 с.
- [7] Moszer I., Glaser P., Danchin A. SubtiList: A relational database for the *Bacillus subtilis* genome // Microbiology. 1995. - V. 141, N 2. - P. 261-268.
- [8] Шевелева С.А. Пробиотики, преобиотики и пробиотические продукты. Современное состояние вопроса // Вопр. питан. -1999. -T.68. -№2. -С.32.

REFERENCES

- [1] Podbereznyj V.V., Poljancev N.I., Ropaeva L.V. Kul'tivirovanie proizvodstvennyh shtammov Bacillus subtilis v podsymoj syvorotke // Veterinarija.- 1996.-N 1.-S. 21-29.
- [2] Bojko N.V., Liseck'a M.V. Razrabotka probiotikov vib 1rkovoshhn: Protiskle-romna jeffektivnost' raznyh shtammov V. subtilis // Nauk. vyun. Uzhgor. un-tu. Ser. Bjul. 1997. - N 4. - S. 194-198.
- [3] Kudrjavcev V.A., Safronova J.I.A., Osadchaja A.I. i dr. Vlijanie zhivyh kul'tur Bacillus subtilis na nespecificheskuju rezistentnost' organizma // Mikrobiologija. T.58, N 2. 1996 - S. 46-53.
- [4] Kuznecova N.I., Smirnova T.A., Shamshina T.N. i dr. Shtamm Bacillus thuringiensis, toksichnyj dlja komnatnoj muhi // Biotehnologija. 1995. -N3-4.-S. 11-14.
- [5] Mitrohin S.D., Shenderov B.A. Mikrobiologicheskie i biohimicheskie pokazateli izmenenija mikroboj jekologii tolstoj kishki krys pod vlijaniem rifampicina. Antibiotiki i himioterapija – 1999.- T. 34 № 6 (482-4).
- [6] Biohimija. Sb. lab. rabot. V.V. Shapkarin, A.P. Korolev, S.B. Gridina, E.P. Zinkevich. Kemerovskij tehnologicheskij institut pishchevoj promyshlennosti. – Kemerovo, 2005.-84 s.
- [7] Moszer I., Glaser P., Danchin A. SubtiList: A relational database for the *Bacillus subtilis* genome // Microbiology. 1995. - V. 141, N 2. - P. 261-268.
- [8] Sheveleva S.A. Probiotiki, prebiotiki i probioticheskie produkty. Sovremennoe sostojanie voprosa // Vopr. pitan. -1999. -T.68. -№2. -S.32

**БИОЛОГИЯЛЫҚ БЕЛСЕНДІ ЗАТТАРДЫҢ КӨЗІ РЕТИНДЕ *Bacillus subtilis*
МИКРОАГЗАЛАР ШТАММДАРЫНЫң ФЕРМЕНТАТИВТІ БЕЛСЕНДІЛІГІН
ЖӘНЕ КУЛЬТИВИРЛЕУ ЖАҒДАЙЛАРЫН ЗЕРТТЕУ**

Д. Тасқынбаева, Б. Ж. Муталиева, Р. Э. Айткулова, Д. Е. Кудасова, А. Д. Дауылбай

М. Әуезов атындағы ОҚМУ, Шымкент, Қазақстан

Тірек сөздер: *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, культивирлеу, ферментативті белсенділік, биологиялық белсенді заттар.

Аннотация. Мақалада типтік және пленкалы штаммдар культурасының гидролитикалық белсенділігі зерттелді. Олар крахмалды гидролиздеу ферменттердің гидролитикалық белсенділігіне түптік культивирлеуді колдану мүмкіндігін көрсетеді. *Bacillus subtilis* бөлінген микроагзалар штаммдарын культивирлеудің оптимальды жағдайлары аныкталды, сонымен катар, субстрат ретінде сыра бөліндісін қолдану тиімді, оның құрамында микроагзалар өсуі үшін қажетті, қоректік заттар мен аминқышқылдар көп кездеседі. Анықталғандай, құрамында сыра үгінділері бар қоректік орталарды культивирлеу кезінде ақуыздар жинақталуы мен гидролитикалық ферменттер кешенінің қарқынды өсуі байқалады, сондықтан бөлініп алынған штаммды түптік культивирлеу оптимальды болып келеді. Көрсетілгендей, түптік культивирлеу кезінде штаммдардың гидролитикалық белсенділігі мәнінің косындысы бірдей болады.

Поступила 02.02.2016 г.