

Л. Я. Василова (к.т.н., доц.), А. А. Хидиятова (магистрант), А. Г. Борисенков (магистрант)

СКРИНИНГ МИКРООРГАНИЗМОВ – ПРОДУЦЕНТОВ АМИЛАЗ

Уфимский государственный нефтяной технический университет,
кафедра биохимии и технологии микробиологических производств
450062, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1; тел. (347) 2431935, e-mail: LiliyaVasilova@yandex.ru

L.Ya. Vasilova, A.A. Khidiyatova, A.G. Borisenkov

SCREENING OF MICROORGANISMS – PRODUCERS OF AMYLASE

Ufa State Petroleum Technological University
1, Kosmonavtov Str., 450062, Ufa, Russia; ph. (347) 2431935, e-mail: LiliyaVasilova@yandex.ru

С целью поиска перспективных продуцентов амилаз проведен скрининг микроорганизмов из почв различных регионов Республики Башкортостан, в результате чего было выделено 75 изолятов, гидролизующих крахмал. При культивировании изолятов на агаризованной крахмал-содержащей среде выявлено 6 штаммов с амилазной активностью более 0.45 МЕ. Наибольшая ферментативная активность, составляющая 1.18 ± 0.01 МЕ, обнаружена у штамма А25.5. По совокупности исследованных морфологических и физиолого-биохимических свойств штамм А25.5 отнесен к роду *Bacillus*.

Ключевые слова: амилаза; *Bacillus sp.*; крахмал; микроорганизмы; скрининг; ферментативная активность.

Амилазы являются одними из промышленно важных ферментов. На мировом рынке ферментов на их долю приходится примерно 25% продаж¹. Амилазы находят широкое применение в пищевой промышленности при осахаривании зернового и картофельного крахмала; при получении различных видов патоки, глюкозы и глюкозофруктозных сиропов; для ускорения процесса созревания и улучшения качества теста; для улучшения качества концентратов и быстро развариваемых блюд². Их используют в качестве добавок к кормам с целью повышения их перевариваемости при кормлении сельскохозяйственных животных и птиц, а также в качестве разжижающего препарата перед развариванием сырья в спиртовой и пивоваренной промышленности³. Они входят в состав ферментных фармацевтических препаратов, улучшающих пищеварение, и синтетических моющих средств для снятия углеводов

The microorganisms screening was carried out from soils in different regions of the Republic of Bashkortostan in order to search for promising producers of amylases. 75 isolates hydrolyzing starch were recovered. As a result of the cultivation of isolates on agarized starch-containing medium, 6 strains with an amylase activity of more than 0.45 IU were detected. The highest enzymatic activity was found for the strain А25.5, it was 1.18 ± 0.01 IU. The strain А25.5 is assigned to the genus *Bacillus* on the basis of studied morphological and physiological-biochemical properties.

Key words: amylase; *Bacillus sp.*; fermentation activity; microorganisms; screening; starch.

ных загрязнений⁴. Амилазы также используются в текстильной промышленности для расщиповки тканей и в целлюлозно-бумажной промышленности для увеличения плотности и прочности бумаги⁵.

Амилазы подразделяются на две группы: эндоамилазы (α -амилаза (КФ 3.2.1.1)) и экзоамилазы (β -амилаза (КФ 3.2.1.2), глюкоамилаза (КФ 3.2.1.3) и α -глюкозидаза (КФ 3.2.1.20))⁶. Эндоамилазы вызывают гидролитическое расщепление внутримолекулярных α -1,4-гликозидных связей крахмала с образованием олигосахаридов различной длины. Экзоамилазы атакуют полисахарид с нередуцирующего конца с образованием низкомолекулярных продуктов, например, глюкозы и мальтозы.

В настоящее время в промышленности выпускаются амилитические препараты грибов (*Aspergillus oryzae*) и бактерий (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* и *Bacillus amyloliquefaciens*)⁷. Однако несмотря на это, поиск новых высокоактивных продуцентов

Дата поступления 28.05.18

амилаз и сегодня остается актуальной задачей.

Цель настоящей работы – поиск микроорганизмов рода *Bacillus*, способных продуцировать амилазы.

Материалы и методы исследования

Скрининг продуцентов амилаз проводили по схеме, представленной на рис. 1.

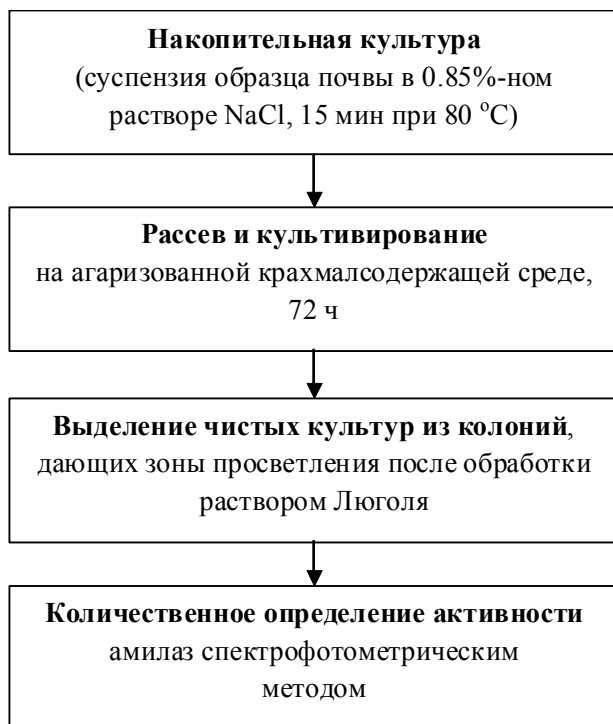


Рис. 1. Схема скрининга продуцентов амилаз

В качестве природных источников новых продуцентов амилаз использовали образцы почвы, отобранные в различных регионах Республики Башкортостан по стандартной методике (ГОСТ 17.4.4.02-84).

Культивирование микроорганизмов.

Микроорганизмы выращивали на агаризованной крахмальной среде (АК) следующего состава (г/л): растворимый крахмал – 5.0; KH_2PO_4 – 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; пептон – 5.0; дрожжевой автолизат – 5.0; агар-агар микробиологический – 15.0; pH среды 6.8 – 7.0.

Питательную среду стерилизовали в автоклаве в течение 30 мин при температуре 120 °C под давлением 1.1 кгс/см². Выращивание микроорганизмов осуществляли на чашках Петри при температуре 37 °C в течение 72 ч.

Выделение почвенных изолятов, обладающих амилазной активностью.

Для выделения бактерий рода *Bacillus* использовали метод⁸. 1 г каждого образца почвы

суспендировали в 5 мл 0.85% физиологического раствора. Затем полученные суспензии нагревали при температуре 80 °C в течение 15 мин, высеивали на плотную агаризованную среду АК и выращивали до формирования колоний (72 ч). После обработки раствором Люголя из колоний, вокруг которых имелись зоны просветления за счет гидролиза крахмала, выделяли чистые культуры микроорганизмов.

Экстракция фермента.

100 мг биомассы суспендировали в 1 мл 0.1М фосфатного буфера (pH 7.0) и экстрагировали внеклеточные ферменты на возвратно-поступательном шейкере в течение 30 мин. Далее биомассу отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 7000 об./мин. Полученные супернатанты использовали в качестве неочищенных ферментных растворов при определении амилазной активности.

Определение амилазной активности.

Активность определяли согласно методике, изложенной в работе⁹. Амилазную активность измеряли по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров: 0.1 мл ферментного раствора инкубировали с 0.1 мл 1%-ного раствора крахмала в течение 30 мин при 25 °C и pH 7.0.

Содержание восстанавливающих сахаров определяли 3,5-динитросалициловым методом¹⁰. К реакционной смеси добавляли 0.2 мл реактива 3,5-динитросалициловой кислоты и кипятили при 100 °C в течение 10 мин. Далее в реакционную смесь добавляли 2 мл воды и измеряли поглощение при 540 нм на фотокolorиметре КФК-2. Количество образовавшегося продукта (мальтозы) определяли по калибровочной кривой.

Амилазную активность фермента выражали в международных единицах: одна единица соответствует количеству фермента, которое вызывает образование 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (в пересчете на мальтозу) в минуту из раствора крахмала при 25 °C и pH 7.0.

Статистическая обработка.

Статистическую обработку результатов осуществляли с применением методов параметрической и непараметрической статистики (вычисление среднеарифметических значений (\bar{x}) и среднеквадратического отклонения ($y(x)$). Достоверность различий между средними величинами оценивали согласно *t*-критерию Стьюдента, различия считались значимыми при $p < 0.05$ ¹¹. Все эксперименты и измерения ферментной активности проводили в трех повторностях.

Среднее арифметическое имеющихся данных рассчитывали по формуле:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n},$$

где n – число измерений.

Среднее квадратичное отклонение рассчитывали по формуле:

$$\sigma(x) = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Относительную погрешность определили как $\Delta = t \cdot \sigma$, где t – коэффициент Стьюдента, определяемый по таблицам значений критерия Стьюдента в зависимости от доверительной вероятности и размера выборки. Окончательная форма записи данных выглядит как $x = \bar{x} \pm \Delta$.

Идентификация изолятов.

Для определения таксономической принадлежности выделенных изолятов изучали их морфологические и физиолого-биохимические свойства. Для этого проводили окраску клеток по Граму; определяли размер, форму, профиль, край и консистенцию колоний; форму клеток, подвижность, спорообразование. Выполнены различные биохимические тесты: использование углеводов в качестве источников углерода и энергии; гидролиз крахмала; разжижение желатины; образование сероводорода и способность к сульфатредукции; восстановление нитратов; отношение к кислороду; каталазная активность; определение способности к брожению¹².

Результаты и обсуждение

На первом этапе скрининга продуцентов амилаз осуществляли посев накопительных культур на поверхность агаризованной крахмалсодержащей среды. Микроорганизмы, способные образовывать активные амилазы, давали зоны просветления вокруг колоний, хорошо просматривающиеся после прокрашивания красителем (рис. 2).

Из 26 образцов почв было выделено 75 штаммов бактерий, продуцирующих амилазы.

На следующем этапе скрининга определялась амилазная активность выделенных культур микроорганизмов, для чего в качестве внеклеточных ферментных препаратов использовали экстракты биомассы, выращенной на агаризованной крахмалсодержащей среде. В результате скрининга было выявлено 6 штаммов с амилазной активностью более 0.45 МЕ. Наибольшая ферментативная активность, составляющая 1.18 ± 0.01 МЕ, обнаружена у штамма A25.5.



Рис. 2. Зоны гидролиза крахмала исследуемыми микроорганизмами

Результаты анализа ферментативной активности наиболее активных штаммов приведены в табл.

Таблица
Амилазная активность ферментных препаратов наиболее активных штаммов
(условия реакции: 0.2 мл неочищенного ферментного раствора; 0.2 мл 1%-ного раствора крахмала; pH 7.0; 25 °C; 30 мин)

№	Штамм	Амилазная активность, МЕ
1	A3.5	0.72±0.01
2	A5.2	0.73±0.01
3	A16.1	0.46±0.01
4	A19.2	0.65±0.01
5	A19.4	0.69±0.01
6	A25.5	1.18±0.01

Для определения таксономического положения наиболее активного изолята A25.5 провели изучение некоторых его морфологических и физиолого-биохимических свойств. Установлено, что клетки изучаемых бактерий представляют собой прямые палочки, с закругленными концами; подвижные; спорообразующие, положительно окрашивающиеся по Граму; каталазоположительные; факультативные аэробы. Бактерии гидролизуют крахмал; не восстанавливают сульфаты и нитраты. Углеводы (глюкозу, сахарозу, лактозу, мальтозу) ферментируют с образованием кислоты. Способны к брожению; продуктом сбраживания является лактат; сам процесс брожения сопровождается выделением газа. По совокупности признаков штамм A25.5 отнесен к роду *Bacillus*.

Таким образом, штамм *Bacillus sp.* A25.5 является перспективным продуцентом амплитических ферментов.

Литература

1. Anto H., Trivedi U., Patel K. Alpha amylase production by *Bacillus cereus* // *Food Technol. Biotechnol.*— 2006.— Pp.241-245.
2. Hamer R.J. Enzymes in the baking industry. Enzymes in food processing // Galsgow: Blackie Academic and Professional, 1995.— Pp.190-222.
3. Van der Maarel, Van der Veen B. Uitdehaag, Leemhuis H., Dijkhuizen L. Properties and applications of starchconverting enzymes of alpha amylase family // *Journal of Biotechnology.*— 2002.— Pp.94-137.
4. A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches / Hendriksen H.V., Pedersen S., Bisgard-Frantzen H. // Patent Application, 1999.— WO 99/35325.
5. A process for surface sizing or coating of paper / Bruinenberg P.M., Hulst A.C., Faber A., Voogd R.H. // European Patent Application, 1996.— EP 0,690,170 A1.
6. Marc J.E., C. van der Maarel., Bart van der Veen. Properties and applications of starch-converting enzymes of the β -amylase family // *Journal of Biotechnology.*— 2002.— Pp.137-155.
7. Van J.H., van Rijswijk W.C. Enzymatic automated dishwasher detergents.— *Chim Oggi.*: Bollier M, 1992.— Pp.10-21.
8. Gordon R.E., Hayes W.C., Pang. The genus *Bacillus* / Department of agriculture handbook.— 1971.— 427 p.
9. Биссвангер Х. Практическая энзимология.— М.: Лаборатория знаний БИНОМ, 2011.— 147 с.
10. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // *Analytical Chemistry.*— 1959.— V.31, №3.— Pp.426-428.
11. Определение активности ферментов / Г.В. По-лыгалина и др.— М.: ДеЛи принт, 2003.— 375 с.
12. Практикум по микробиологии / под ред. Н.С. Егорова.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976.— 307 с.

References

1. Anto H., Trivedi U., Patel K. [Alpha amylase production by *Bacillus cereus*]. *Food Technol. Biotechnol.*, 2006, pp.241-245.
2. Hamer R.J. [Enzymes in the baking industry. Enzymes in food processing]. Galsgow, Blackie Academic and Professional, 1995, pp.190-222.
3. Van der Maarel, Van der Veen B. Uitdehaag, Leemhuis H., Dijkhuizen L. [Properties and applications of starchconverting enzymes of alpha amylase family]. *Journal of Biotechnology*, 2002, pp.94-137.
4. Hendriksen H.V., Pedersen S., Bisgard-Frantzen H. [A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches]. Patent Application, 1999, WO 99/35325.
5. Bruinenberg P.M., Hulst A.C., Faber A., Voogd R.H. [A process for surface sizing or coating of paper]. *European Patent Application*, 1996. EP 0,690,170 A1.
6. Marc J.E., C. van der Maarel., Bart van der Veen. [Properties and applications of starch-converting enzymes of the β -amylase family]. *Journal of Biotechnology*, 2002, pp.137-155.
7. Van J.H., van Rijswijk W.C. [Enzymatic automated dishwasher detergents]. *Chim Oggi.*: Bollier M, 1992, pp.10-21.
8. Gordon R.E., Hayes W.C., Pang. [The genus *Bacillus*]. Department of agriculture handbook, 1971, 427 p.
9. Bissvanger K.H. *Prakticheskaya enzimologiya* [Practical enzymology]. Moscow, Laboratoriya znaniy BINOM Publ., 2011, 147 p.
10. Miller G.L. [Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar]. *Analytical Chemistry*, 1959, vol.31, no.3, pp.426-428.
11. Polygalina G.V. *Opredeleniye aktivnosti fermentov* [Determination of enzyme activity]. Moscow, DeLi print Publ., 2003, 375 p.
12. *Praktikum po mikrobiologii* [Workshop on Microbiology]. Ed. N.S. Yegorov. Moscow, Moscow State University Publ., 1976, 307 p.