

Бактерии рода *Bacillus* как перспективные продуценты амилолитических ферментов в пищевой промышленности

М.З. Давлятшина

Самарский государственный технический университет, Самара, Россия

Обоснование. В настоящее время амилазы находят широкое применение во многих отраслях промышленности, но особенно в пищевой отрасли. Так, амилазы крайне востребованы в качестве модификаторов крахмала, который используют в пищу непосредственно или в качестве эмульгатора и загустителя [1].

Хотя амилолитические ферменты были получены из различных источников, микробные ферменты всегда преобладали [2]. Из-за промышленной важности амилаз существует постоянный интерес к выделению новых штаммов-продуцентов и повышению амилолитической активности ферментов методами оптимизации условий культивирования. Поэтому исследование бактерий рода *Bacillus* как продуцентов амилаз является актуальной задачей.

Цель — исследовать возможность получения амилаз бактериями *Bacillus licheniformis*.

Методы. На первом этапе была проведена идентификация музейной культуры *Bacillus licheniformis* B-10958, предоставленной Биоресурсным центром «Курчатовского института». Для этого было проведено оживление и получение чистой культуры микроорганизмов на плотной питательной L-среде следующего состава: дрожжевой экстракт — 5,0 г/л; пептон — 15 г/л; NaCl — 5,0 г/л; агар — 15,0 г/л. Условия культивирования: температура 37 °C, 3 сут.

Для определения тинкториальных свойств микроорганизмов была проведена окраска по методу Грама [3], для определения морфологических свойств — посев на агаризованную среду Гаузе-2: триптон — 3,0 г/л; пептон — 5,0 г/л; NaCl — 5,0 г/л; глюкоза — 10,0 г/л; агар — 20,0 г/л в чашках Петри. При оценке тинкториальных и морфологических признаков установлено, что исследуемые микроорганизмы относятся к виду *Bacillus licheniformis*.

Также была осуществлена стандартизация посевного материала. Для этого было проведено культивирование бактерий по схеме: скошенный агар в 10 мл L-среды при 37 °C в течение 12 ч; пересев 5 % культуры в 50 мл L-среды, инкубирование при 37 °C и 160 об/мин в шейкере-инкубаторе 12 ч; приготовление серии разведений от 10^{-1} до 10^{-9} ; инкубирование в шейкере-инкубаторе с отбором проб каждые 12 ч для построения кривых роста разведений.

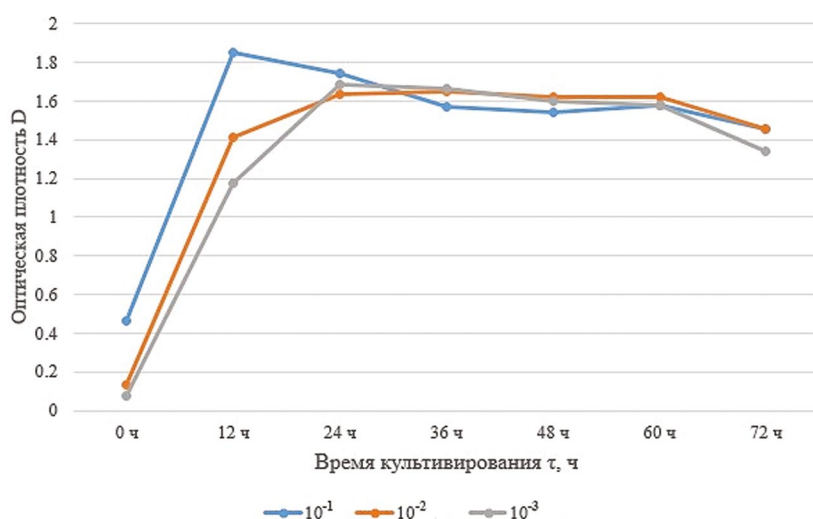
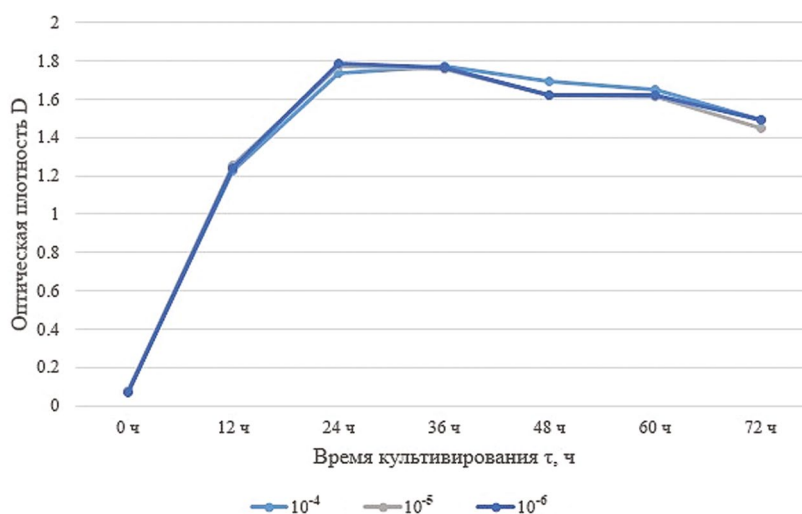
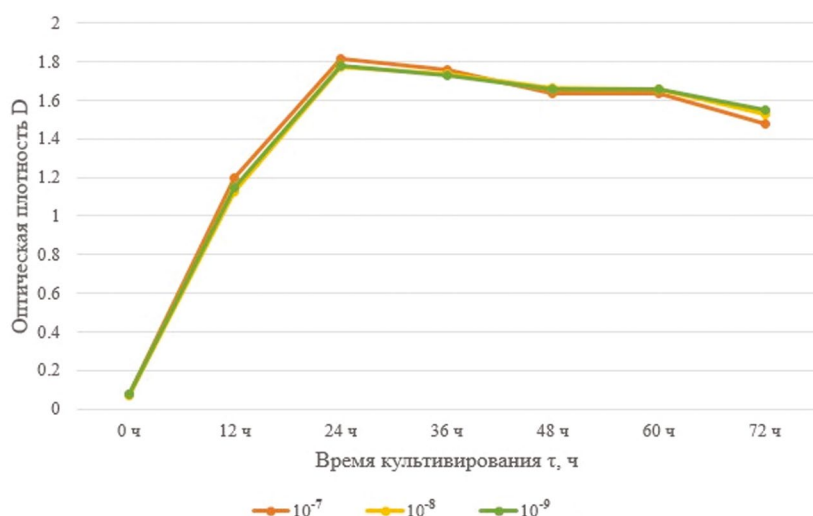
Для соотношения оптической плотности с концентрацией клеток был проведен подсчет клеток в камере Горяева [4]. Также была отработана методика определения амилолитической активности ферментов [5].

Результаты. Графики зависимости оптической плотности от времени культивирования для разведений представлены на рис. 1–3.

По графикам видно, что спустя 12 ч оптическая плотность зашкаливает и не попадает в интервал 0,1–1,0, в котором соблюдается закон Бугера–Ламберта–Бера. На момент начала культивирования для разведений от 10^{-3} до 10^{-9} также не соблюдается закон.

Пик оптической плотности приходится на 24 ч, после чего наступает стационарная фаза и спустя 60 ч фаза отмирания. Поэтому для культивирования штамма достаточно 72 ч. Оптимальным выбрано разведение посевного материала 10^{-2} , что соответствует концентрации клеток $14 \cdot 10^6$ клеток/мл.

Для анализа изменения активности амилазы в течение времени каждые 12 ч проводили определения для разведения 10^{-2} . С начала культивирования и спустя 12 ч значения активности отрицательные, что обосновано, т. к. культура находится в лаг-фазе. Спустя 24 ч активность положительна, пик приходится на 48 ч, что соответствует стационарной фазе роста культуры. Отсюда можно сделать вывод, что достаточно проводить культивирование бактерий в течение 48 ч при стандартных условиях.

Рис. 1. Кривые роста разведений от 10^{-1} до 10^{-3} Рис. 2. Кривые роста разведений от 10^{-4} до 10^{-6} Рис. 3. Кривые роста разведений от 10^{-7} до 10^{-9}

Выводы. Проведена стандартизация посевного материала, оптимальная концентрация — $14 \cdot 10^6$ клеток/мл; отработана методика определения амилалитической активности ферментов; установлено, что пик

активности приходится на 48 ч, поэтому культивирование необходимо проводить до этого времени включительно.

Ключевые слова: пищевая промышленность; амилазные ферменты; бактерии; амилазная активность; микробиология; штаммы-продуценты.

Список литературы

1. Сулейменова Ж.Б., Блиева Р.К., Нармуратова Г.Б., и др. α -Амилаза и ее применение в разных отраслях промышленности // Микробиология и вирусология. 2023. № 3(42). С. 52–67. doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.03 EDN: RHCIEQ
2. Ticiane C.F., Haroldo Y.K., Bello Koblit M.G. Microbial amylolytic enzymes in foods: Technological importance of the *Bacillus* genus // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2021. N 35. P. 1–12. doi: 10.1016/j.bcab.2021.102054
3. Руденко Е.Ю. Общая биология и микробиология: лабораторный практикум. Самара: Самарский государственный технический университет, 2018.
4. ГОСТ 20264.4-89 Препараты ферментные. Методы определения амилазной активности. Москва: Государственный комитет СССР по стандартам, 1989. 27 с.
5. ГОСТ 34440-2018 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения амилазной активности. Москва: Стандартинформ, 2018. 19 с.

Сведения об авторе:

Марьям Зефяровна Давлятшина — студентка, группа 2-ВБШ-23ВБШ-101М, Высшая биотехнологическая школа; Самарский государственный технический университет, Самара, Россия. E-mail: m.davlyatshina@mail.ru

Сведения о научном руководителе:

Зинаида Евгеньевна Машенко — кандидат фармацевтических наук, доцент, директор Высшей биотехнологической школы; Самарский государственный технический университет, Самара, Россия. E-mail: mzinaida@yandex.ru