

ДИНАМИКА АМИЛОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *MEDUSOMYCES GISEVII* (ЧАЙНОГО ГРИБА) В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Добрыня Ю.М.¹, Аванесян С.С.¹, Бондарева Н.И.¹, Тимченко Л.Д.¹, Ржепаковский И.В.¹, Симечёва Е. И.¹

¹ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет», Ставрополь, Россия, e-mail: dobruniajulia@rambler.ru

На основании анализа литературных источников выявлено, что в настоящее время представляется актуальным поиск микроорганизмов продуцентов ферментов, в том числе амилазы. Одним из перспективных в этом плане биообъектов является природный микробный симбионт *Medusomyces gisevii* (чайный гриб), который благодаря неидентичности микробиологического состава и различным условиям выращивания может иметь различный компонентный состав метаболитов. Проведены исследования амилолитической активности культуральной жидкости *Medusomyces gisevii* на 10-е, 20-е и 30-е сутки культивирования. Выращивание гриба осуществлялось в лабораторных условиях по классической методике. Установлено, что данный микроорганизм начинает проявлять амилолитическую активность уже на 10-е сутки культивирования в стандартной питательной среде и сохраняет ее на всем протяжении эксперимента (30 суток). С течением времени амилолитическая активность повышается. Однако интенсивность метаболизма микроорганизмов, критерием которой является соотношение общей и экзогенной амилазы, наиболее выражена на ранних сроках культивации.

Ключевые слова: симбионт *Medusomyces gisevii*, чайный гриб, культуральная жидкость, амилаза

THE DYNAMICS OF THE AMYLOLYTIC ACTIVITY OF THE CULTURE LIQUID *MEDUSOMYCES GISEVII* (TEA FUNGUS) DURING CULTIVATION

Dobrynja J.M.¹, Avanesjan S.S.¹, Bondareva N.I.¹, Timchenko L.D.¹, Rzhepakovskij I.V.¹, Simechjove E. I.¹

¹North-Caucasian Federal University, Stavropol, Russia, e-mail: dobruniajulia@rambler.ru

On the basis of literature analysis revealed that at present, it is urgent to search for microorganisms producing enzymes, including amylase. One of the most promising in terms of biological objects is a natural microbial symbiont *Medusomyces gisevii* (tea fungus), which, thanks to the identical, microbiological composition and different growing conditions may have a different composition of metabolites. Studies of the amylolytic activity of the culture liquid *Medusomyces gisevii* on the 10th, 20th and 30th day of cultivation. Cultivation of the fungus was carried out in the laboratory according to the classic method. It is established that this organism starts to show the amylolytic activity already on the 10th day of cultivation in standard culture medium and stores it in the course of the experiment (30 days). Over time the amylolytic activity increases. However, the intensity of metabolism of the microorganisms, the criterion of which is the ratio of the total and exogenous amylase is most pronounced in the early stages of cultivation.

Keywords: symbiont *Medusomyces gisevii*, tea fungus, Kombucha, the culture fluid amylase.

Биокатализаторы использовались человеком на протяжении многих веков, и на сегодняшний день количество ферментов, применяемых в различных сферах жизни, постоянно растет. В настоящее время актуальным является поиск наиболее перспективных способов получения ферментов, так как производство препаратов на их основе занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии, а объемы продукции постоянно увеличиваются [3]. Столь широкое применение ферментов связано с их биологической ролью – способностью во много раз увеличивать скорость химических реакций, а также чрезвычайно высокой специфичностью по отношению к определенным веществам и типам реакций.

Достаточно широко и успешно применяются амилазы, которые делятся на альфа-, бета- и гамма-амилазу, что связано с их распространением в природе, а также с особой специфичностью по отношению к субстрату.

Существенна роль амилаз в живом организме. Данные ферменты относятся к классу гликозил-гидролаз и катализируют гидролиз крахмала, гликогена и родственных полисахаридов и олигосахаридов с образованием моносахаридов, играя, по нашему мнению, существенную роль в обеспечении механизма пребиотического действия. Амилазная активность микроорганизмов — симбионтов организма человека может иметь клиническое значение в таких процессах, как, например, гидролиз крахмала кишечной микрофлорой или ингибирование образования биопленок у патогенных бактерий [1].

Механизм действия амилаз обуславливает их применение в областях производства, использующих крахмалосодержащее сырье. К ним относится медицинская, текстильная, мясомолочная, спиртовая промышленность, тонкие химические технологии, пивоварение, хлебопечение, производство детергентов, кормовых добавок в сельском хозяйстве, переработка отходов мясной и птицеперерабатывающей промышленности [6].

В период, предшествующий интенсивному развитию ферментной промышленности, главным источником амилазы в странах Европы был солод. Из животного сырья получали амилазы, применяющиеся в медицинских целях [3]. Общепринято, что одним из главных источников амилаз являются микроорганизмы. Для получения промышленных препаратов амилазы используют грибы – *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* и *Aspergillus wentii*. Среди бактерий к активным продуцентам амилаз относятся некоторые бациллы (*Bacillus macerans*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*), псевдомонады и различные виды стрептомицетов. Амилаза, выделяемая из культуры *Bacillus stearothermophilus*, не утрачивает своей активности даже при кратковременном нагревании до 100⁰С. Амилолитические ферменты синтезируют также некоторые дрожжи и дрожжеподобные грибы родов *Saccharomyces*, *Candida*, *Endomycopsis* и *Endomyces* [2].

На сегодняшний день не утрачивает актуальности изыскание новых микроорганизмов — продуцентов амилазы. По нашему мнению, в качестве приоритетных в этом плане могут выступать природные микробные симбионты, обладающие высокой ферментативной активностью. Одним из таких объектов является природный симбионт *Medusomyces gisevii* (чайный гриб), который представляет собой сложную микробную ассоциацию в виде массы (зооглеи) на поверхности жидкости и пылевидного осадка на дне сосуда [4]. Достоверно известно, что в состав симбиоза входит несколько видов уксуснокислых бактерий и дрожжей, однако многие авторы при описании этого организма отмечают неидентичность микробиологического состава образцов, отобранных из различных регионов

культивирования. Этот факт в совокупности с неидентичностью воспроизведения условий выращивания может приводить к различному компонентному составу метаболитов чайного гриба. В литературных источниках имеются упоминания о содержании в культуральной жидкости чайного гриба фермента амилазы, но данные эти единичны и не содержат сведений о количестве этого фермента на разных этапах культивирования.

Цель работы

В связи с вышеизложенным целью исследования явилось изучение динамики проявления амилалитической активности культуральной жидкости чайного гриба при выращивании его в условиях проблемной научно-исследовательской лаборатории «Экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии» ЦКП Северо-Кавказского Федерального университета.

Материалы и методы исследования

В качестве исследуемого объекта выступала культуральная жидкость *Medusomyces gisevii* (чайный гриб), отобранная на разных этапах культивирования (10-е, 20-е и 30-е сутки), которое осуществляли в течение месяца при комнатной температуре по классической методике на питательной среде, состоящей из кипяченой водопроводной воды, сахарозы (10%), экстракта черного чая (0,1%).

Маркером интенсивности метаболизма бактериальных клеток, входящих в симбионт, послужило количество общей амилазы в нативной культуральной жидкости, содержащей, кроме жидкой части, фрагменты волокон гриба и микроорганизмы. Однако на практике в биотехнологических и медицинских целях не исключено использование свободного от различных примесей культурального фильтрата исследуемой субстанции. Кроме того, соотношение количества амилазы (общей) в нефилтрованной культуральной жидкости к данному показателю в фильтрате, по нашему мнению, в той или иной мере отражает интенсивность экзогенной метаболической активности микроорганизмов-продуцентов, что характеризует их биотехнологический потенциал.

В связи с вышеизложенным каждая проба культуральной жидкости подразделялась на 2 части. Одна часть подвергалась ультрамикрофильтрации через фильтр 0,22 мкм с целью освобождения исследуемого субстрата от присутствия в нем крупных примесей, нитей и микроорганизмов. Вторая часть пробы фильтрации не подвергалась. Все исследования проводились в десятикратном повторе.

Для определения амилалитической активности использовали метод Каравея [5] в нашей модификации. Принцип метода основан на колориметрическом определении концентрации амилодекстрина по степени интенсивности реакции с йодом и длине волны 650 нм до и после ферментативного гидролиза крахмала амилазой, содержащейся в

культуральной среде. При этом нами были определены экспериментальным путем соотношения субстрата и ферментной составляющей. За единицу активности фермента принимали его количество, содержащееся в 1 мл исследуемого биологического раствора, которое расщепляет амилодекстрин (в мкг) за 1 мин при 37°C.

Удельную амилолитическую активность в пробах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D_k - D_n}{D_k \cdot t \cdot V} \times 1000,$$

где X – удельная амилолитическая активность ферментного препарата культуральной жидкости чайного гриба (мкг/мин×мл); D_к – оптическая плотность контрольного раствора (нм); D_п – оптическая плотность опытного образца (нм); t – время инкубации фермент-субстратной смеси (мин); V – объем пробы (мл).

Результаты исследований

Результаты исследования, представленные в таблице 1, свидетельствуют о том, что культуральная жидкость чайного гриба проявляет амилолитическую активность, которая закономерно возрастает с 10-х по 30-е сутки культивирования до 167,8±3,1мкг/мин×мл.

Таблица 1

Средние показатели амилолитической активности культуральной жидкости чайного гриба на разные сутки культивирования, (M±m)*

Сроки культивирования, n=10	Амилолитическая активность культуральной жидкости, мкг/мин×мл	
	нефильтрованная	фильтрованная
10 суток	114,3±4,5	67,3± 4,2
20 суток	141,5±3,2	73.7±2,2
30 суток	167,8±3,1	80,1±4,2

*достоверность по тексту.

При этом амилаза, содержащаяся в фильтрате, составляла 58,88 %, 52,08% и 47,73% соответственно на 10-е, 20-е, 30-е сутки культивирования от количества общей амилазы, находящейся в нефильтрованной культуральной среде (при P ≤0,05).

Заключение

Амилолитическая активность культуральной жидкости сохраняется на протяжении всего периода исследования (30 суток). При этом часть фермента адсорбируется на плотных составных компонентах субстанции, однако практически 50% амилазы сохраняется и в

филtrate. Указанные результаты позволяют рассматривать обе исследуемые субстанции как перспективное биотехнологическое сырье — источник амилазы.

Интенсивность метаболизма микроорганизмов, критерием которой является соотношение общей и экзогенной амилазы, наиболее выражена на ранних сроках культивации.

Исследование проведено при финансовой поддержке Минобрнауки России, в рамках выполнения базовой части государственного задания (2014/2016).

Список литературы

1. Бруслик Н.Л. Сравнительная характеристика амилазной активности грамположительных бактерий / Н.Л. Бруслик, А.Р. Каюмов, М.И. Богачев, Д.Р. Яруллина // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация – 2014 – № 2 – С. 47–51.
2. Галич И.П. Амилазы микроорганизмов / И.П. Галич – Киев: Наукова думка, 2000 – 195 с.
3. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов / И.М. Грачева – М.: Агропромиздат, 2008. – 358 с.
4. Даниелян Л.Т. Чайный гриб (Kombucha) и его биологические особенности / Л.Т. Даниелян – М.: Медицина, 2005. — 176 с.
5. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии / В.Г. Колб, В.С. Камышников – Минск: Беларусь, 1982. – 234 с.
6. Костылева Е.В. Разработка биотехнологического процесса получения комплексных ферментных препаратов термостабильной α -амилазы и протеазы на основе нового мутантного штамма *Bacillus licheniformis*: дис ... канд. техн. наук: 05.18.07 / Костылева Елена Викторовна. – М., 2003 – 157 с.

Рецензенты:

Федько Н.А., д.м.н., профессор, декан факультета гуманитарного и медико-биологического образования ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет», 355000, Россия, г. Ставрополь;

Джандарова Т.И., д.б.н., доцент, профессор кафедры анатомии и физиологии ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский Федеральный университет», г. Ставрополь.