

УДК 579.64 : 577.15

**ПРЕПАРАТЫ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ИЗ ГАЛОАЛКАЛОТОЛЕРАНТНЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА****А.Ю. Максимов<sup>1,2</sup>, Я.Е. Быкова<sup>1</sup>, Е.В. Пьянкова<sup>2</sup>, В.А. Щетко<sup>3</sup>, Ю.Г. Максимова<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup> «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, Россия<sup>2</sup> Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия<sup>3</sup> Государственное научное учреждение «Институт микробиологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Применение ферментных препаратов для целей сельского хозяйства достаточно перспективно. Основными сферами их использования являются кормопроизводство и переработка отходов. Введение ферментов в корма позволяет сократить расходы на единицу продукции и повысить рентабельность животноводческих хозяйств. В корма обычно вносят такие ферменты, как ксиланаза, глюканидаза, фитаза, поликарбогидразные препараты, кроме этого, показано применение нормальных ферментов пищеварительного тракта – протеазы, амилазы, липазы. Дополнительное введение этих ферментов полезно для улучшения пищеварения новорожденных цыплят. Незрелость пищеварительной системы цыплят может приводить к недостаточному использованию питательных веществ, при этом переваривание пищи, а не способность поглощать питательные вещества является основным ограничивающим фактором их роста [1]. Кроме этого, ферменты добавляют и в корма других сельскохозяйственных животных для улучшения усвояемости.

Амилаза (КФ 3.2.1.1) расщепляет крахмал зерна до декстринов и сахаров. Введение этого фермента в комбикорма для поросят и телят позволяет увеличить норму ввода зерна. В связи с пониженной секрецией амилазы у 2–3-х недельных цыплят крахмал переваривается не полностью, кроме этого, они не способны гидролизовать амилопектин, т. к. вырабатывают только  $\alpha$ -амилазу и не продуцируют изо-амилазу ( $\alpha$ -1,6-глюкозидазу). Также экзогенная амилаза влияет на активность дисахаридазы в кишечнике, повышая количество доступной глюкозы и ее абсорбцию [2]. Липаза (КФ 3.1.1.3) расщепляет жиры с образованием моно- и диглицеридов и свободных жирных кислот. Известно, что жиры для животных и птицы являются трудно усвояемыми продуктами. Показано, что добавление в корм экзогенной липазы интенсифицирует работу органов внутренней секреции животных: концентрация эндогенного трипсина и амилазы повышается на 32,5 и 69,3 % соответственно, улучшается и ускоряется пищеварительный процесс, понижается стоимость кормов, повышается интенсивность роста свиней и птицы [3]. Целлюлаза (КФ 3.2.1.4) расщепляет целлюлозу до низкомолекулярных углеводов и глюкозы. При внесении этого фермента в комбикорма для птиц и свиней с низкой питательностью и высоким содержанием клетчатки повышается его усвояемость. Ферменты, расщепляющие некрахмалистые полисахариды, в частности, целлюлозу, гемицеллюлозу, пектиновые вещества, способствуют росту нормальной микрофлоры в кишечнике за счет гидролиза высокомолекулярных полимеров растительных клеток до олигосахаридов [4].

Поиск новых продуцентов гидролитических ферментов среди микроорганизмов остается весьма актуальным. Особый интерес представляют микроорганизмы экстремальных сред, в том числе, высокощелочных и засоленных биотопов. Галоалкалотолерантные бактерии являются источником внеклеточных гидролитических ферментов, функционирующих в условиях щелочной среды и высокой минерализации [5, 6].

Цель настоящей работы явилось получение ферментных препаратов из галоалкалотолерантных бактерий, изолированных нами ранее из сред содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» (г. Березники, Пермский край), и изучение свойств (рН-зависимости активности, термостабильности).

С поверхности высокоминерализованного грунта старой карты содового шламохранилища были выделены, идентифицированы [7] и депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов штаммы *Pseudomonas peli* ВКМ В-3617D и *Bacillus aequororis* ВКМ В-3610D. *P. peli* ВКМ В-3617D выращивали на среде Пфеннига (г/л):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,3;  $\text{MgCl}_2$ , 0,3;  $\text{CaCl}_2$ , 0,03; дрожжевой экстракт, 0,5; раствор микроэлементов по Липперту–Витману (1 мл), источник азота 0,03 % мочевины, источник углерода 1 % глицерин, рН 8. *B. aequororis* ВКМ В-3610D выращивали на среде (г/л): пептон – 10, глюкоза – 10, дрожжевой экстракт – 5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 10, рН 11.

Биомассу концентрировали центрифугированием в течение 15 мин при 5000 об/мин, отмывали однократно от среды фосфатным буфером с соответствующим рН, центрифугировали повторно и разрушали ультразвуком (УЗГ8–0,4/22, ВНИИ ТВЧ г. Санкт-Петербург, Россия) при частоте 22 кГц с охлаждением до 0–4 °С: *P. peli* ВКМ В-3617D – 10 раз по 15 сек, *B. aequororis* ВКМ В-3610D – 7 раз по 20 сек с охлаждением осадка. Гомогенат центрифугировали 20 мин при 5000 об/мин и 4 °С, затем фракционировали белок сульфатом аммония, доводя концентрацию до 35 % от насыщающей.

В пробах определяли концентрацию белка по Бредфорд и активность липазы и амилазы [7]. В 4 мл фосфатного буфера  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 8) с ферментным препаратом вносили 50 мкл р-нитрофениллаурата до конечной концентрации 0,125 мМ, проводили реакцию при 25 °С в течение 1 ч и определяли активность липазы по приросту оптической плотности среды при  $\lambda$  405 нм на спектрофотометре Ultraspec 3000 («GE Healthcare», США). Активность амилазы оценивали с помощью коммерческого набора реактивов для определения амилазы Альфа-Амилаза-Ольвекс (ООО «Ольвекс Диагностикум», Россия), следуя инструкциям производителя. Оптическую плотность среды измеряли при  $\lambda$  405 нм на планшетном ридере Infinite M1000 («Тесан», Швейцария). Зависимость активности от рН определяли в фосфатном буфере с рН от 5 до 10 при температуре 25°С. Термостабильность определяли следующим образом: ферментный препарат в фосфатном буфере (рН 8) нагревали при температурах 50, 70, 90°С в твердотельном термостате («Термит», Россия), через 15, 30, 45 и 60 мин отбирали пробы, разводили фосфатным буфером и при 25°С проводили реакцию с р-нитрофениллауратом.

После разрушения бактериальных клеток и высаливания сульфатом аммония был получен ферментный препарат из *B. aequororis* ВКМ В-3610D. Степень очистки липазы *B. aequororis* ВКМ В-3610D составила 27,8 раз (Таблица 1). Ферментный препарат из *P. peli* ВКМ В-3617D был получен в виде лизата клеток после ультразвуковой обработки, при этом активность увеличивалась в 10 раз по сравнению с неразрушенными клетками. *B. aequororis* ВКМ В-3610D проявлял также амилазную активность, но после разрушения клеток она была незначительна.

Таблица 1 – Получение ферментного препарата липазы из клеток *B. aequororis* ВКМ В-3610D.

Стадии выделения	Концентрация белка, мг/л	Активность липазы	
		мкмоль/мин/л	мкмоль/мин/г
Клетки	22,0*	0,75	3,39
Гомогенат после УЗ обработки	96,9	17,49±1,28	1,80±0,12
Высаливание $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 35 % от насыщения	86,7	20,86±5,03	2,47±0,70

Примечание: \*Концентрация сухих клеток, мг/л

Изучали зависимость активности липазы от рН и термостабильность ферментного препарата. Показано, что препарат, содержащий липазу из *B. aequororis* ВКМ В-3610D, проявляет более высокую активность в щелочном диапазоне рН (Таблица 2). При рН 5 ферментативная активность *B. aequororis* ВКМ В-3610D была полностью ингибирована, а у *P. peli* ВКМ В-3617D не проявлялась и при рН 6. Липазная активность этого препарата также увеличивалась при возрастании рН.

Таблица 2 – Зависимость липазной активности от рН, мкмоль/мин/л

Штаммы	рН	рН				
		6	7	8	9	10
<i>B. aequororis</i> ВКМ В-3610D		2,91±0,27	3,05±0,50	4,89±0,53	12,45±0,68	15,33±0,36
<i>P. peli</i> ВКМ В-3617D		0	0,73	1,28	2,00	4,83

Определено, что термостабильность ферментных препаратов, содержащих липазу *B. aequororis* ВКМ В-3610D и *P. peli* ВКМ В-3617D, достаточно высока. Так, прогрев при 90°С в течение 1 ч не приводил к значительной потере активности (Таблица 3).

Таблица 3 – Термостабильность ферментного препарата, мкмоль/мин/л

Время экспозиции, мин	50°C	70°C	90°C
<i>B. aequororis</i> ВКМ В-3610D			
15	9,58±0,22	11,03±0,74	8,28±1,05
30	7,23±1,18	7,13±0,33	9,22±0,74
45	11,18±1,60	10,24±0,76	11,49±0,61
60	9,46±0,12	6,80±2,63	8,25±1,23
<i>P. peli</i> ВКМ В-3617D			
15	6,19±0,61	4,83±0,26	3,67±0,16
30	4,10±0,55	4,10±0,05	7,42±1,23
45	4,10±0,83	4,52±0,08	7,29±0,57
60	7,04±0,63	4,31±0,16	15,39±0,00

Таким образом, из *B. aequororis* ВКМ В-3610D и *P. peli* ВКМ В-3617D были получены ферментные препараты липазы. Липаза проявляла более высокую активность в щелочном диапазоне рН и была термостабильной, что делает такой препарат перспективным для использования в кормопроизводстве.

**Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/507**

#### Литература

1. Kaczmarek S.A., Rogiewicz A., Mogielnicka M., Rutkowski A., Jones R.O., Slominski B.A. The effect of protease, amylase, and nonstarch polysaccharide-degrading enzyme supplementation on nutrient utilization and growth performance of broiler chickens fed corn-soybean meal-based diets // Poultry Science. 2014. 93: 1745–1753.
2. Крюков В.С., Зиновьев С.В., Некрасов Р.В., Глебова И.В., Галецкий В.Б. Полиферментные препараты в кормлении моногастрических животных // Аграрная наука. 2021. 348 (4): 35–43.
3. Щербинин С. Экзогенная липаза снижает стоимость корма // Корма и кормопроизводство. 2018. 4: 55–57.
4. Феоктистова Н.В., Марданова А.М., Лутфуллин М.Т., Богомольная Л.М., Шарипова М.Р. Биопрепараты микробного происхождения в птицеводстве // Ученые записки Казанского университета. Серия естественные науки. 2018, 160(3): 395–418.
5. Sarethy I.P., Saxena Y., Kapoor A., Sharma M., Sharma S.K., Gupta V., Gupta S. Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology // J Ind Microbiol Biotechnol. 2011. 38: 769–790.
6. Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms // Environmental Technology. 2010. 31(8–9): 825–834.
7. Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Выделение и идентификация алкалолентных бактерий с гидролитической активностью из содового шламохранилища // Микробиология. 2021. 90(2): 155–165.