

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ГИДРОБИОНТОВ

DOI: 10.24143/2073-5529-2019-1-91-100
УДК 664.951.7:639.4

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ КИШЕЧНИКА ТРЕПАНГА

Н. Н. Ковалев, Ю. М. Позднякова, Е. М. Панчишина, В. В. Кращенко

*Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет,
Владивосток, Российская Федерация*

Проведено исследование по определению возможности культивирования микрофлоры кишечника трепанга в среде рыбо-пептонного агара и среде для морских организмов с внесением альгината, коллоидного хитина и морской воды. Построены кривые роста микроорганизмов в зависимости от способа заготовки посевного материала и сроков его хранения. Оценено влияние продолжительности хранения кишечника трепанга в замороженном виде на численность культивируемой микрофлоры. Выявлено, что оптимальным способом заготовки пищеварительных органов трепанга является замораживание и хранение не более 3-х месяцев. Такой способ позволяет сохранить большое количество жизнеспособных клеток. Описаны культуральные и биохимические характеристики микроорганизмов. Установлено, что видовой состав кишечной микрофлоры трепанга, подвергнутой замораживанию, представлен грамположительными бактериями в виде палочек и кокков. Определены протеолитическая, амилолитическая и хитинолитическая активности кишечника трепанга различных способов заготовки. Выявлены особенности спектра ферментативной активности культивированной микробной массы в зависимости от способа заготовки посевного материала. Определено влияние модификации культуральной среды на активацию и подавление синтеза гидролитических ферментов. Микробная масса, полученная с добавлением альгината, характеризовалась наибольшей активностью углеводгидролизующих ферментов: амилаз и хитиназ. Полученные результаты трактуются как обоснование разработки технологии пробиотиков при культивировании трепанга.

Ключевые слова: трепанг, пищеварительные органы, культуральная среда, микробная масса, протеазы, хитиназы, амилазы.

Для цитирования: Ковалев Н. Н., Позднякова Ю. М., Панчишина Е. М., Кращенко В. В. Ферментативная активность культивируемых микроорганизмов кишечника трепанга // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. 2019. № 1. С. 91–100. DOI: 10.24143/2073-5529-2019-1-91-100.

Введение

Основной проблемой при разведении трепанга в марикультурных хозяйствах остается получение кормов необходимого качества, которое учитывает стадии развития трепанга. Помимо углеводов, которые трепанг получает с водорослями, и ила значительную долю в рационе их питания составляют бактерии. Их содержание в естественных условиях составляет от 30 до 100 % органического углерода грунта [1]. Бактерии являются не только источником питания трепанга, но и выполняют роль элементов неспецифической иммунной системы, служат продуцентами различных ферментов, работа которых способствует разложению трудноусвояемых компонентов корма в пищеварительном тракте трепанга [2]. Симбионтная микрофлора, обитающая в кишечнике, играет важную роль в синтезе различных биологически активных компонентов, способствует нормальному протеканию физиологических реакций организма. Но при искусственном культивировании трепангов существует проблема роста бактерий, не свойственных данному организму, что приводит к заболеваемости животных, ухудшает усвоение поступающей пищи [3]. В настоящее время наиболее перспективным способом решения этих проблем является применение препаратов на основе микроорганизмов – представителей нормальной микрофлоры

хозяина. Такие микроорганизмы способны активно действовать на бактериальные патогены, корректировать механизмы иммунной защиты макроорганизма и смягчать влияние неблагоприятных факторов [4].

Целью настоящей работы являлось исследование активности протеолитических, амилолитических и хитинолитических ферментов в кишечнике трепанга различными способами заготовки, а также микробной массы, полученной путем культивирования микроорганизмов внутренностей трепанга на различных средах.

Материалы и методы исследования

Для проведения исследований по изучению микрофлоры пищеварительной системы трепанга дальневосточного в октябре 2017 г. в бухте Северная, п. Славянка Приморского края, были собраны особи трепанга. В лаборатории кишечника трепангов были извлечены и подвергнуты замораживанию и сублимационной сушке.

Таким образом, объектами исследований служили образцы внутренностей трепанга замороженные, сушеные, а также микроорганизмы, выделенные из них.

Для исследования условий выделения микроорганизмов пищеварительной системы трепанга применяли два способа: глубинный посев и метод Дригальского [5].

Для определения условий культивирования микрофлоры внутренностей трепанга исследовали интенсивность их роста по накоплению биомассы. Для культивирования микроорганизмов использовали среды РПА (рыбо-пептонный агар) и СММ (среда для морских организмов) [5] с добавлением в экспериментальные среды альгината, коллоидного хитина и морской воды.

Число клеток микроорганизмов определяли методом глубинного посева на плотные среды (чашечный метод) [5].

Для изучения морфологии (форма клеток, ультраструктура клеточной стенки) выделенных микроорганизмов готовили препараты и окрашивали их по Граму, в модификации Хукера.

Для изучения биохимических свойств выделенных микроорганизмов определяли их ферментативную активность [6].

Для обнаружения сахаролитических ферментов исследуемые культуры бактерий засеивали в питательные среды Гисса, содержащие глюкозу, лактозу, мальтозу и сахарозу. После инкубирования отмечали изменение цвета питательной среды и газообразование, которое обусловлено действием кислых продуктов жизнедеятельности растущего микроорганизма.

Для выявления протеолитических ферментов исследуемые культуры микроорганизмов засеивали в питательные среды, содержащие белок.

Определение протеолитической активности микроорганизмов на желатине производили посевом (уколом) в столбик питательной среды с желатиной. После инкубирования отмечали разжижение питательной среды.

Способность микроорганизмов к расщеплению казеина выявляли на молочном агаре Эйкмана по обнаружению зон просветления среды вокруг выросших колоний. Чем больше диаметр светлой зоны, четко выделяющейся на общем молочно-мутном фоне среды, тем выше казеинолитическая активность бактерий.

Определение биомассы микроорганизмов проводили нефелометрическим методом.

Определение содержания белка проводили по методу Лоури [7].

Протеолитическую активность определяли по методу Каверзневой [8].

Амилолитическую активность проводили спектрофотометрически по количеству продуктов гидролиза крахмала, окрашенных йодом [9].

Хитинолитическую активность (экзохитиназную) определяли по выходу образующегося при гидролизе хитина N-ацетилглюкозамина, содержание которого определяли в растворе гидролизата после центрифугирования с 4-диметиламинопарабензальдегидом [10].

Результаты и их обсуждение

Для определения способов заготовки кишечника трепанга с целью последующего культивирования микроорганизмов необходимо было установить, в каком из видов сырья лучше всего сохраняется жизнеспособность микрофлоры. Для этого определяли численность микроорганизмов в образцах, выращенных на РПА и СММ (табл. 1).

Численность микроорганизмов внутренних органов трепанга в зависимости от способа их заготовки

Способ заготовки	Питательная среда	Количество микроорганизмов, кл/г
Охлаждение	РПА	$2,1 \times 10^4$
	СММ	Рост спорообразующих микроорганизмов
Замораживание	РПА	$4,2 \times 10^4$
	СММ	$4,3 \times 10^5$
Сублимационная сушка	РПА	$1,5 \times 10^3$
	СММ	$9,0 \times 10^3$

Из данных табл. 1 следует, что сублимационная сушка внутренних органов трепанга оказывает подавляющее действие на численность культивируемой микрофлоры, тогда как к охлаждению и замораживанию последняя более устойчива.

На рис. 1 приведены результаты оценки влияния продолжительности морозильного хранения кишечника трепанга на численность культивируемой микрофлоры.

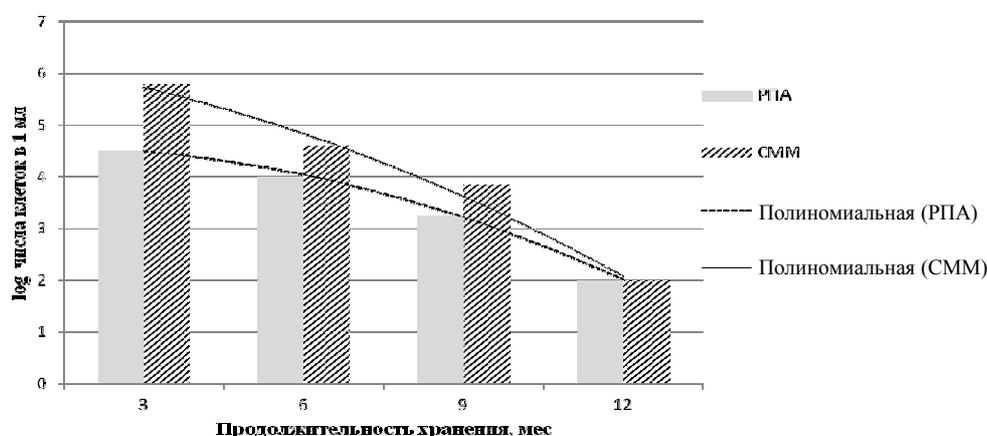


Рис. 1. Динамика численности культивируемых микроорганизмов из замороженного кишечника трепанга в процессе хранения при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$

Кривая роста микроорганизмов (рис. 1) свидетельствует о том, что продолжительность хранения внутренних органов трепанга в замороженном виде отрицательно влияет на жизнеспособность клеток.

По результатам исследования также можно отметить, что количество микроорганизмов, выделенных на СММ, в первые 6 месяцев хранения несколько больше, следовательно, эта среда является наиболее благоприятной для культивирования микрофлоры трепанга.

Для изучения морфологических особенностей и выявления ферментативной активности микроорганизмов, выделенных из замороженных пищеварительных органов трепанга, были выбраны отдельные поверхностные колонии, отличающиеся по культуральным признакам. Видовой состав кишечной микрофлоры трепанга, подвергнутой замораживанию, представлен грамположительными бактериями в виде палочек и кокков.

Таким образом, в ходе исследования установлено, что оптимальным способом заготовки кишечника трепанга, позволяющим сохранить большое количество жизнеспособных клеток, является замораживание и хранение не более 3 мес. В связи с тем, что выделенная микрофлора не проявляла выраженной ферментативной активности, проводили выделение микроорганизмов из пищевой системы трепанга методом Дригальского.

Для выделения микроорганизмов из кишечника трепанга предварительно получали накопительную культуру. В качестве элективной среды использовали РПБ (бульон). Для посева на поверхность плотной питательной среды наносили каплю накопленной культуры и распределяли ее стеклянным стерильным шпателем (шпатель Дригальского).

Результаты культивирования свидетельствуют о том, что характер роста микроорганизмов, выделенных из замороженных пищеварительных органов трепанга, более интенсивный, чем посевы из образцов, полученных методом сублимации. Зависимости интенсивности роста

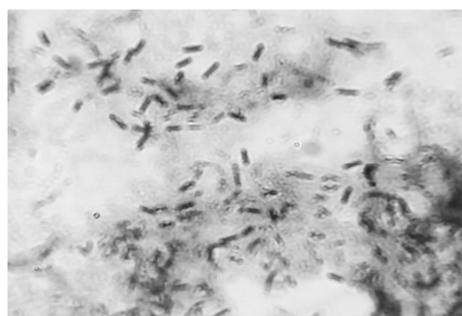
от используемой питательной среды не выявлено. Выделенные микроорганизмы имели отличительные особенности в зависимости от исходного посевного материала по морфологическим и биохимическим признакам.

Отличительных особенностей по морфологическим и культуральным признакам в зависимости от используемой питательной среды для культивирования микроорганизмов из сухих образцов не выявлено (табл. 2, рис. 2).

Таблица 2

Результаты изучения морфологии и ферментативной активности выделенных микроорганизмов

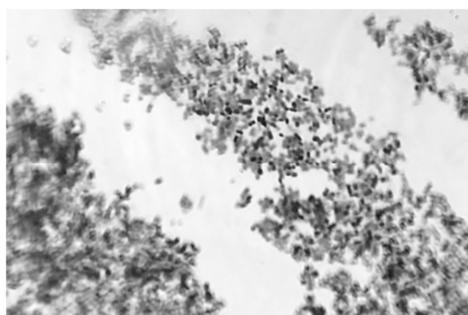
Условное обозначение	Культуральные признаки	Отношение к окраске по Граму; форма бактерий	Биохимическая характеристика					
			Сбраживание сахарозы	Сбраживание мальтозы	Сбраживание лактозы	Сбраживание глюкозы	Расщепление желатины	Расщепление казеина
РПА (сушеный кишечник)	Крупные колонии (диаметр 6–8 мм) округлой формы, с неровными краями, плоские, бесцветные (серо-белые), поверхность сухая	Гр +; палочки со спорами (рис. 2, а)	–	–	–	–	+	+
СММ (сушеный кишечник)		Гр +; палочки со спорами (рис. 2, б)	–	–	–	–	+	+
РПА (мороженный кишечник)	Колонии среднего размера (диаметр 2–4 мм), округлой формы, выпуклые, края ровные, блестящие, гладкие, белого (бежевого) цвета	Гр ±; смешанная культура (рис. 2, в)	±	–	–	+ без газообразования	–	–
СММ (мороженный кишечник)		Гр –; палочки кокковой формы (в виде бочонков) (рис. 2, г)	±	–	–	+ без газообразования	–	–



а



б



в



г

Рис. 2. Рост колоний микроорганизмов, выделенных из сухих внутренностей на среде РПА (а), СММ (б); из мороженных внутренностей на среде РПА (в), СММ (г)

Так, на средах РПА и СММ в результате посевов выделялись спорообразующие палочковидные грамположительные формы бактерий, проявляющие идентичные биохимические свойства.

Отличительные особенности микроскопических картин (рис. 2, в, з) микрофлоры, выделенной из замороженного кишечника, можно объяснить следующим образом: вероятно, что среда СММ наиболее благоприятная для культивирования чистой культуры ГР– форм, проявляющих сахаролитическую активность, тогда как при использовании среды РПА культура была смешанной и в ней преобладали Гр+ формы микроорганизмов.

Эффективность процесса пищеварения определяется действием ферментов пищеварительного тракта и симбионтной микрофлоры.

Для определения общей пищеварительной активности трепанга проводили определение ферментативной активности тканей его кишечника биохимическими методами. Известно, что основным компонентом пищи трепанга являются водоросли. С целью проверки способности трепанга усваивать углеводы были определены общая амилолитическая и хитинолитическая активности кишечника трепанга различных способов заготовки (табл. 3).

Таблица 3

Амилолитическая и хитинолитическая активность внутренностей трепанга, Е/г

Вид сырья (кишечник)	Амилолитическая активность, Е/г	Хитинолитическая активность, Е/г
Внутренности-сырец	0,26 ± 0,01	40,0 ± 2,00
Мороженые (срок хранения 2 мес)	0	37,5 ± 1,50
Сублимированные	3,08 ± 0,13	5,75 ± 0,28

При замораживании и хранении пищеварительных органов трепанга при –18 °С в течение 2-х месяцев амилолитическая активность не определяется. В то же время сублимирование, как способ заготовки сырья, сопровождается повышением активности с 0,26 до 3,08 Е/г сырья.

Известно, что до 4 % пищевого рациона трепанга составляет хитин. Способность организмов усваивать этот полисахарид определяется наличием в пищеварительном тракте фермента хитиназы. В результате исследований установлено, что внутренности-сырец и свежемороженые внутренности трепанга характеризуются высокой хитинолитической активностью, которая составляет 40,0 и 37,5 Е/г сырья соответственно (табл. 3). В то же время консервирование внутренностей методом сублимации приводило к снижению активности фермента в 6,5 раз. Очевидно, условия проведения сублимации оказывают инактивирующий эффект на хитиназы.

Проведенные исследования позволяют сделать заключение, что внутренности трепанга обладают значительной активностью в отношении пищевых субстратов трепанга и могут быть заготовлены для дальнейшей переработки методом сублимирования.

Белковая компонента пищевого рациона трепанга представлена органическими остатками детрита. Поэтому исследование протеолитической активности внутренностей трепанга важно для понимания пищевой биоконверсии субстратов пищеварения. Из представленных в табл. 4 данных видно, что в кишечнике трепанга представлен весь спектр рН-зависимых протеаз.

Таблица 4

Протеолитическая активность ферментов во внутренностях трепанга разной формы заготовки

Вид сырья	рН 8	рН 6	рН 3
	Протеолитическая активность, Е/г		
Внутренности-сырец	0,047 ±	0,059 ±	0,1 ±
Мороженые (срок хранения 2 мес)	0,032 ±	0,017 ±	0,085 ±
Сублимированные	0	0,459 ±	0,35 ±

Наибольшую активность проявляют кислые протеазы. Активность нейтральных и основных протеаз в кишечнике трепанга равнозначна и составляет около 50 % от таковой при pH 3.

Замораживание и хранение кишечника трепанга при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 2-х месяцев сопровождалось снижением активности протеаз на 15–71 %. Наибольшее снижение активности при морозильном хранении отмечено для нейтральных протеаз.

Сублимирование пищеварительных органов трепанга, как способ заготовки сырья, приводило к элиминации активности щелочных протеолитических ферментов. В то же время активность нейтральных и кислых протеаз вследствие потери влаги (в пересчете на 1 г сырья) увеличилась в 7,8 и 3,5 раза соответственно.

В вышеприведенных экспериментах в качестве ферментных препаратов нами использовались водные экстракты гомогенатов пищеварительной системы трепанга. Следует отметить, что в гомогенате, кроме стенок кишечника, присутствовала и симбионтная микрофлора, которая также обладает ферментативной активностью. Поэтому вышеприведенные результаты следует трактовать как сумму ферментативной активности тканей кишечника и микрофлоры.

Для определения ферментативной активности микрофлоры кишечника трепанга проведена серия экспериментов по наработке микробной массы (ММ) на среде РПА и определению активности ферментов в ней (табл. 5).

Таблица 5

Ферментативная активность микроорганизмов внутренностей трепанга, культивированных на среде РПА с различными субстратами

Среда	Образец	Концентрация белка	Протеазы, Е/мг белка			Амилазы, Е/мг белка	Хитиназы, Е/мг белка
			pH 3,0	pH 6,0	pH 8,0		
РПА	Центрифугат, Е/мл	1,2 мг/мл	0,023	0	0	0	0
РПА	ММ сырая	0,42 мг/мл (12,8 %)	0,063	0	0	32,2 ±	0,001 ±
РПА + морская вода	ММ субл.*	0,02 мг/мл (2 %)	0	0	0	26,4 ±	0,006 ±
РПА + альгинат	ММ субл.	0,09 мг/мл (9,1 %)	0	0	0	35,2 ±	0,200 ±
	ММ, обработанная ультразвуком, субл.	0,33 мг/мл (32,8 %)	0,19	0	0	51,3 ±	0
РПА + хитин	ММ субл.	0,03 мг/мл (3,2 %)	0	0	0	13,3 ±	0,005 ±

*Биохимические показатели определялись в предварительно сублимационно высушенных образцах.

Предварительно ММ с культуральной средой подвергали центрифугированию при 3 500 об/мин, отделяя центрифугат и ММ.

Установлено, что центрифугат культуральной среды содержит значительное количество растворимого белка. При этом в центрифугате определялась незначительная активность только кислых протеаз. Амилолитическая и хитинолитическая активности в центрифугате не определялись. Сырая ММ, выделенная в виде осадка после центрифугирования, содержала водорастворимые белки в концентрации в 3 раза меньше, чем центрифугат. Активность кислых протеаз в ММ была в 2 раза выше, чем в центрифугате. Активность нейтральных и щелочных протеаз в ММ не выявлена. Однако следует отметить, что в сырой ММ определяется следовая активность хитиназ и значительная активность амилолитических ферментов.

Известно, что высеваемые микроорганизмы гидробионтов показывают более высокие темпы роста при культивировании на средах, содержащих морскую воду. Микробная масса, культивированная на среде РПА с добавлением морской воды, отличалась в 21 раз меньшим содержанием растворимого белка.

Следует отметить, что микроорганизмы, выращенные на такой среде, не проявляли протеолитической активности. Амилолитическая активность ММ была в 1,2 раза ниже, чем у микроорганизмов, культивированных на среде без добавления морской воды. В то же время внесение морской воды в культуральную среду способствовало увеличению хитиназной активности в 6 раз.

Изучив ферментативную активность бактерий, выделенных из замороженного кишечника трепанга, можно отметить, что исследуемые культуры являются активными продуцентами различных пищеварительных гидролаз. Кроме того, высокие значения активности ферментов отмечены у культуры бактерий, выделенной на среде РПА, приготовленной с использованием морской воды.

Сублимированная ММ, культивированная на среде с добавлением альгината, отличалась невысоким содержанием растворимого белка. Следует отметить, что в сублимированной ММ не выявлена активность протеолитических ферментов. Амилолитическая активность ММ составляла 35,2 Е/мг белка и по этому показателю не отличалась от сырой ММ, культивированной на среде без добавления альгината. Отличительной особенностью ММ, культивированной на среде РПА + альгинат, является выявленная хитинолитическая активность в количестве 0,2 Е/мг белка.

Выявленный факт отсутствия протеолитической активности в сублимированной ММ позволил сделать предположение о внутриклеточной локализации ферментов. Для проверки данного предположения перед сублимационной сушкой ММ проведена ее обработка ультразвуком при амплитуде 100 Гц в течение 5 мин. В результате проведенного эксперимента установлено, что предварительная обработка ультразвуком повышала концентрацию растворимого белка в 3,7 раза, а также способствовала переходу в экстракт кислых протеаз, активность которых составила 0,19 Е/мг белка. Также выявлено повышение амилолитической активности в 1,5 раза, по сравнению с ММ, не обработанной ультразвуком. В то же время обработка ультразвуком приводила к ингибированию активности хитиназ. Поскольку обработка ультразвуком сопровождается повышением температуры образцов, можно предположить, что хитиназы микроорганизмов внутренностей трепанга имеют низкую термостабильность.

Результаты проведенных исследований позволяют предположить, что основные ферменты пищеварения микрофлоры имеют эндогенную локализацию.

Культивирование микрофлоры кишечника трепанга на среде РПА с добавлением коллоидного хитина сопровождалось образованием меньшего количества водорастворимых белков (3,2 %) по сравнению с микрофлорой, культивированной на той же среде с добавлением альгината. При этом в сублимированной ММ активность протеолитических ферментов не выявлялась. Удивительным является факт наличия невысокой (0,005 Е/мг белка) хитинолитической активности в ММ. Следует также отметить, что данный образец ММ характеризовался самой низкой активностью амилолитических ферментов (13,3 Е/мг белка).

Заключение

Исследование ферментативной активности кишечника трепанга и его микрофлоры является необходимым обоснованием разработки технологии пробиотиков как компонентов искусственных кормов. Спектр ферментов пищеварительного тракта трепанга должен обеспечивать расщепление основных компонентов пищи. Выявленные высокие амилолитическая и хитинолитическая активности обуславливают эффективность усвоения углеводных компонентов пищи. В кишечнике трепанга представлен весь спектр рН-зависимых протеаз, что указывает на важность белковой компоненты в пищевом рационе трепанга.

Исследование количественного содержания микроорганизмов в кишечнике трепанга различных способов заготовки позволяет утверждать, что оптимальным способом, обеспечивающим сохранение жизнеспособных микроорганизмов, является замораживание и хранение сроком не более 3 месяцев. Данный способ консервации позволяет получать культуру микроорганизмов, обладающих высокой углеводгидролизующей способностью.

Оптимальным способом для выделения микрофлоры из замороженных внутренностей можно считать способ, предусматривающий предварительное накопление культуры и последующий высеив на плотные питательные среды, СММ или РПА, с последующим выделением чистой культуры из изолированных колоний. Зависимости интенсивности роста от используемой питательной среды не выявлено.

В культивированной микробной массе выявлены высокая амилолитическая активность и незначительные протеолитическая и хитинолитическая активности. По-видимому, именно симбионтная микрофлора кишечника трепанга обеспечивает переваривание сложного комплекса углеводов водорослей, представленного целлюлозой, альгинатом и другими углеводами. Модификация

культуральной среды хитином и морской водой сопровождалась подавлением выработки протеолитических ферментов. В то же время модификация среды альгинатом приводила к активации синтеза кислых протеаз и амилаз.

Представленные в работе данные могут являться обоснованием разработки технологии пробиотиков с различным спектром ферментативной активности для использования в рецептурах кормов для трепанга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tunncliffe V., Risk M. J.* Relationships between the bivalve *Macoma baltica* and bacteria in intertidal sediments: Minas Basin, Bay of Fundy // *J. Marine Resources*. 1977. V. 35. N. 3. P. 499–507.
2. *Елинов Н. П.* Общие закономерности строения и развития микробов-продуцентов биологически активных веществ. Л.: Медицина, 1977. 285 с.
3. *Бурлаченко И. В., Судакова Н. В., Балакирев Е. И., Мордовцев Д. А., Малик Е. В.* Перспективные пробиотики для осетровых рыб // *Рыбное хозяйство*. 2006. № 3. С. 12–16.
4. *Урсова Н. И.* Перспективы применения пробиотиков метаболитного типа в педиатрии // *Consilium-medicum*. 2003. Т. 5. № 6. С. 3–6.
5. *Руководство к практическим занятиям по микробиологии: практ. пособие / под ред. Н. С. Егорова.* М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. 215 с.
6. *Лабинская А. С.* Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина, 1972. 480 с.
7. *Lowry O., Rosenbrough N., Parr A., Randall R.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. N. 1. P. 265–276.
8. *Каверзнева Е. Д.* Стандартный метод определения протеолитической активности для комплексных препаратов протеаз // *Прикладная биохимия и микробиология*. 1971. Т. 7. № 2. С. 225–228.
9. *Полыгалова Г. В., Чередниченко В. С., Римарева Л. В.* Определение активности ферментов: справ. М.: Де Ли принт, 2003. 375 с.
10. *Рысакова К. С., Новиков В. Ю., Мухин В. А., Овчинникова С. И.* Обнаружение хитинолитической активности в пищеварительных органах гидробионтов Баренцева моря // *Вестн. Мурман. гос. техн. ун-та*. 2006. Т. 9. № 5. С. 785–790.

Статья поступила в редакцию 03.12.2018

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Ковалев Николай Николаевич – Россия, 690087, Владивосток; Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет; д-р биол. наук; главный научный сотрудник НИИ инновационных биотехнологий; kovalevnnb1@yandex.ru.

Позднякова Юлия Михайловна – Россия, 690087, Владивосток; Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет; канд. техн. наук; директор НИИ инновационных биотехнологий; pozdnyakova.julia@yandex.ru.

Панчишина Екатерина Мироновна – Россия, 690087, Владивосток; Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет; канд. техн. наук; доцент кафедры пищевой биотехнологии; ekaterina.pan.8@mail.ru.

Кращенко Виктория Владимировна – Россия, 690087, Владивосток; Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет; канд. техн. наук; зав. кафедрой пищевой биотехнологии; victoriy_vl@mail.ru.



ENZYMATIC ACTIVITY OF CULTIVATED MICROORGANISMS IN TREPANG INTESTINE

N. N. Kovalev, Yu. M. Pozdnyakova, E. M. Panchishina, V. V. Kraschenko

Far Eastern State Technical University of Fisheries,
Vladivostok, Russian Federation

Abstract. The article describes the study of possible cultivating the intestinal of sea cucumber microflora in the environment of fish-peptone agar and in the environment for marine organisms with introducing alginate, colloidal chitin and seawater. The growth curves of microorganisms have been built, according to the method of preparing inoculum and of its storage life. The influence of the time of keeping the sea cucumber intestine under refrigeration on the abundance of cultivated bacterial population has been estimated. It has been found that the best way to preserve the digestive organs of the sea cucumber is to freeze and store them up to 3 months. This method helps to save a large number of viable cells. Cultural and biochemical characteristics of microorganisms have been described. It has been stated that the species composition of the intestinal microflora of the sea cucumber subjected to freezing is represented by gram-positive bacteria (bacillus and cocci). The proteolytic, amylolytic and chitinolytic activities of the sea cucumber intestine preserved by different methods were determined. There have been explored the features of enzymatic activity spectrum of the cultured microbial mass subject to the method of preparing seed. The influence of the modification of the culture environment on activation and suppression of the synthesis of hydrolytic enzymes has been determined. The microbial mass obtained with the addition of alginate was characterized by the highest activity of carbohydrate-hydrating enzymes: amylases and chitinases. The obtained results are interpreted as justification for the development of probiotic technology in sea cucumber cultivating.

Key words: sea cucumber, digestive organs, culture environment, microbial mass, proteases, chitinases, amylases.

For citation: Kovalev N. N., Pozdnyakova Yu. M., Panchishina E. M., Kraschenko V. V. Enzymatic activity of cultivated microorganisms in trepang intestine. *Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Fishing Industry*. 2019;1:91-100. (In Russ.) DOI: 10.24143/2073-5529-2019-1-91-100.

REFERENCES

1. Tunnicliffe V., Risk M. J. Relationships between the bivalve *Macoma baltica* and bacteria in intertidal sediments: Minas Basin, Bay of Fundy. *J. Marine Resources*, 1977, vol. 35, no. 3, pp. 499-507.
2. Elinov N. P. *Obshchie zakonomernosti stroeniia i razvitiia mikrobov-produtsentov biologicheskii aktivnykh veshchestv* [General regularities of structure and development of microbes-producers of bioactive substances]. Leningrad, Meditsina Publ., 1977. 285 p.
3. Burlachenko I. V., Sudakova N. V., Balakirev E. I., Mordovtsev D. A., Malik E. V. Perspektivnye probiotiki dlia osetrovyykh ryb [Promising probiotics for sturgeons]. *Rybnoe khoziaistvo*, 2006, no. 3, pp. 12-16.
4. Ursova N. I. Perspektivy primeneniia probiotikov metabolitnogo tipa v pediatrii [Future of using metabolic probiotics in pediatrics]. *Consilium-medicum*, 2003, vol. 5, no. 6, pp. 3-6.
5. *Rukovodstvo k prakticheskim zaniatiim po mikrobiologii: prakticheskoe posobie* [Instructions on microbiological workshops: teaching guide]. Pod redaktsiei N. S. Egorova. Moscow, Izd-vo Moskovskogo un-ta, 1983. 215 p.
6. Labinskaia A. S. *Mikrobiologiia s tekhnikai mikrobiologicheskikh issledovani* [Microbiology and techniques of microbiologic research]. Moscow, Meditsina Publ., 1972. 480 p.
7. Lowry O., Rosenbrough N., Parr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265-276.
8. Kaverzneva E. D. Standartnyi metod opredeleniia proteoliticheskoi aktivnosti dlia kompleksnykh preparatov proteaz [A standard method to determine proteolytic activity for compound preparations of proteases]. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*, 1971, vol. 7, no. 2, pp. 225-228.
9. Polygalina G. V., Cherednichenko V. S., Rimareva L. V. *Opreделение активности ферментов: справочник* [Determining enzyme activity: reference book]. Moscow, De Li print Publ., 2003. 375 p.
10. Rysakova K. S., Novikov V. Iu., Mukhin V. A., Ovchinnikova S. I. Obnaruzhenie khitinoliticheskoi aktivnosti v pishchevaritel'nykh organakh gidrobiontov Barentseva moria [Detecting chitinolytic activity in digestive organs of hydrobionts in the Barents Sea]. *Vestnik Murmanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta*, 2006, vol. 9, no. 5, pp. 785-790.

The article submitted to the editors 03.12.2018

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Kovalev Nikolai Nikolayevich – Russia, 690087, Vladivostok; Far Eastern State Technical University of Fisheries; Doctor of Biological Sciences; Chief Researcher of the Research Institute of Innovative Biotechnology; kovalevnn61@yandex.ru.

Pozdnyakova Yuliya Mikhailovna – Russia, 690087, Vladivostok; Far Eastern State Technical University of Fisheries; Candidate of Technical Sciences; Head of the Research Institute of Innovative Biotechnology; pozdnyakova.julia@yandex.ru.

Panchishina Ekaterina Mironovna – Russia, 690087, Vladivostok; Far Eastern State Technical University of Fisheries; Candidate of Technical Sciences; Assistant Professor of the Department of Food Biotechnology; ekaterina.pan.8@mail.ru.

Krashchenko Viktoria Vladimirovna – Russia, 690087, Vladivostok; Far Eastern State Technical University of Fisheries; Candidate of Technical Sciences; Head of the Department of Food Biotechnology; victoriy_vl@mail.ru.

