УДК 579.64

Е.Ф. Чернявская, ассист.; Н.С. Салук, студ.
(БГТУ, г. Минск)

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОЦЕНКИ ПЕКТОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОТЕНЦИАЛЬНО ФИТОПАТОГЕННЫХБАКТЕРИЙ

Ферменты занимают ключевые позиции в различных метаболических путях в клетке, следовательно, их анализ позволяет не только оценить уровни активности отдельных белков, но и определить интенсивность протекания обмена веществ в живых организмах. Особый интерес вызывают разного рода литические ферменты, применяемые в пищевой и фармацевтической промышленности для расщепления биополимеров. К таким ферментам можно отнести и пектолитичекие.

Пектолитические ферменты широко используются в различных областях. Процесс гидролиза пектиновых веществ имеет большое значение для переработки плодов, ягод и овощей. Использование пектолитических ферментов позволяет резко повысить сокоотделение (на 5–25 %) при производстве осветленных соков, особенно из тех плодов и ягод, которые не имеют собственных пектолитических ферментов и содержат повышенные количества пектина (слива, алыча, абрикосы, персики, груши и др.). При изготовлении фруктово-ягодных напитков с мякотью ферменты позволяют снять нежелательный желирующий эффект [1].

Помимо вышеобозначенного применения наличие пектолитической активности может являться признаком фитопатогенности микроорганизмов, так как многие возбудители болезней растений, в частности «черной ножки», характеризуются высоким пектолитическим потенциалом [2].

Основной целью нашего исследования стал поиск оптимального способа оценки пектолитической активности потенциально фитопатогенных бактерий, выделенных с поверхности пораженных ростков рассады томатов. Объектами исследования стали бактерии штаммов pecto (коллекция кафедры биотехнологии), а также 5` и 7 (выделенные в данном исследовании).

Для оценки пектолитичекого потенциала использовали метод, описанный M.P. Starr [2], с внесенными модификациями. Для упрощения из методики было удалена стадия диализа ферментного препарата, что позволило сократить время на проведения эксперимента с 28 до 6 часов. Культуральная жидкость в отличие от ферментного препа-

рата обладает меньшей активностью, что привело к необходимости увеличения времени гидролиза пектина с одного до четырех часов, однако модифицированный метод менее трудоемок и характеризуется большей экспрессностью по сравнению со стандартным, а, следовательно, пригоден для предварительной оценки пектолитического потенциала выделяемых микроорганизмов. Кроме того, выдерживание культуральной жидкости с пектином при разных температурах позволяет параллельно с оценкой пектолитической активности определять температурный оптимум анализируемых ферментов. Схема эксперимента приведена на рисунке 1.

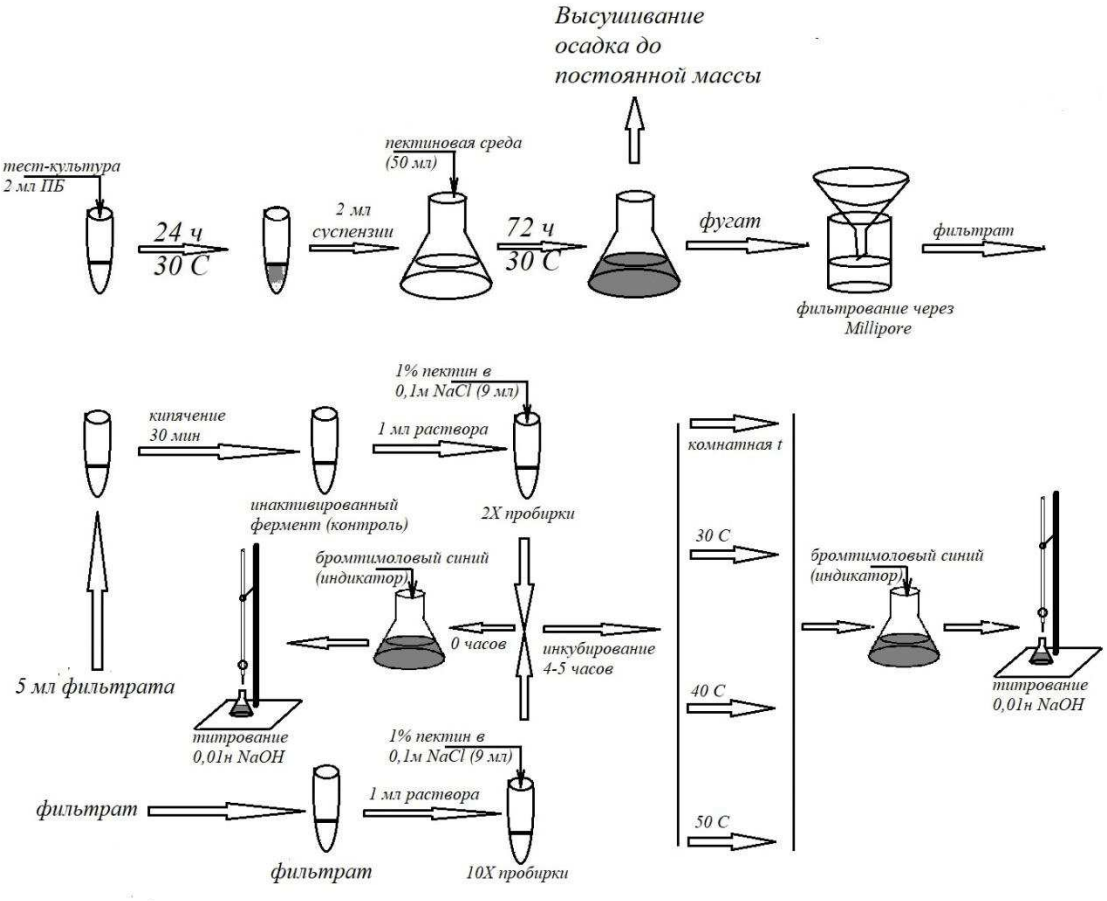

Рисунок 1 – Схема определения пектолитической активности бактерий

Бактерии выращивают в условиях аэрации на синтетической пектиновой среде при температуре 28-30 °С в течении 48-72 часов. Культуральную жидкость центрифигируют при 6000 об/мин в течении 10 мин, а затем фильтруют через фильтр Millipore (0,45 нм). Пектинэстеразную активность определяют методом титрования. Готовят реакционную смесь, содержащую 1% пектин в 0,1 м NaCl (9 мл) и 1 мл раствора ферментного препарата. В качестве контроля используют пробу фермента, которую предварительно кипятят в течении 30 мин.

Реакционную смесь доводят до pH 7,0 и инкубируют в течении 4-5 часов при 30 °С. Начальную точку снимают сразу после смешивания реакционной смеси. Проинкубированную реакционную смесь титруют до pH 7,0 NaOH (0,01 н) в присутствии бромтимолового синего.

Результаты оценки пектолитического потенциала анализируемых штаммов приведены в таблице.

Таблица – Пектолитический потенциал анализируемых штаммов

Температура инкубирования	Объем NaOH (0,01 н), пошедший на титрование культуральной жидкости штамма, мл		
	pecto	5`	7
20°С	1,88	0,78	0,12
30 °С	2,52	**1,26**	0,37
40 °С	4,34	0,62	0,84
50 °С	**7,27**	0,35	**1,35**
Контроль (30 °С)	0,00	0,01	0,00
Пектолитический потенциал (мл NaOH/г сухой биомассы)	**24,2**	**7,4**	**4,3**

На основании полученных данных можно утверждать, что наибольшим пектолитической активностью, а значит и потенциальной фитопатогенностью, обладают бактерии штамма pecto, наименьшей – штамма 7. Оптимум температур для бактерий штаммов pecto и 7 составил 50 °С, для штамма 5` – 30 °С. Модифицированный метод позволяет за небольшой промежуток времени оценить пектолитическую активность большого количества штаммов микроорганизмов с достаточно высокой точностью, а также определить температурный оптимум синтезируемых микроорганизмами пектиназ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Priyanka S. Bharadwaj Isolation, Purification and Characterization of Pectinase enzyme from *Streptomyces thermocarboxydus* / Priyanka S. Bharadwaj, Prajna M. Udupa // J. Clin. Microbiol. Biochem. Technol. – №5(1). – 2019. – P. 001-006.

2. M.P. Starr Pectolytic Activity of Phytopathogenic Xanthomonads/ M.P. Starr, S Nasuno// J. gen. Microbiol. – № 46. – 1967. – P. 425-433.