

УДК 577.152.32

α -АМІЛАЗИ *Aspergillus flavus* var. *oryzae* І *Bacillus subtilis*: СУБСТРАТНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА СТІЙКІСТЬ ДО НИЗКИ ХІМІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

К. В. Авдіюк
Л. Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Отримано 18.03.2013

Вивчено здатність α -амілаз двох продуцентів — *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 і *Bacillus subtilis* 147 розщеплювати різні вуглеводні субстрати, зокрема мальтозу, сахарозу, трегалозу, декстрин, α - та β -циклодекстрин, амілозу, амілопектин, глікоген, пулулан, розчинний картопляний, нерозчинний картопляний, кукурудзяний, пшеничний крохмалі, декстран 500. Показано, що досліджені ензими відрізняються за субстратною специфічністю. α -Амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 найефективніше гідролізує розчинний картопляний і пшеничний крохмалі, тоді як α -амілаза *B. subtilis* 147 — тільки пшеничний. Ензими обох продуцентів не розщеплюють мальтозу, α -циклодекстрин і декстран 500. Дуже низьку здатність до гідролізу пулулану виявлено в α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428, тимчасом як α -амілаза *B. subtilis* 147 взагалі не діє на нього. Найнижчі значення константи Міхаеліса для обох ензимів спостерігаються під час розщеплення глікогену, що свідчить про найвищу афінність саме до цього субстрату. Вивчення впливу хімічно активних речовин на активність досліджених ензимів показало, що α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147 є стійкими до сечовини, дезоксихолевої кислоти, Твіну-80, Тритону X-100 та перексиду водню, тобто вони є конкурентоспроможними з раніше описаними ензимами. Це уможливило у майбутньому використання цих ензимів у різних галузях промисловості, передусім у виробництві мийних засобів.

Ключевые слова: *Aspergillus flavus* var. *oryzae*, *Bacillus subtilis*, α -амілаза, субстратна специфічність, константа Міхаеліса, хімічно активні речовини.

З розвитком біотехнології розширилися межі застосування препаратів ензимів у різних галузях промисловості. Перше місце за інтенсивністю використання серед різноманітних позаклітинних ензимів посідають α -амілази (КФ 3.2.1.1, 1,4- α -D-глюкан-глюкогидролази) — ензими, які не впорядковано каталізують гідроліз внутрішніх α -(1,4)-глікозидних зв'язків у полісахаридах, що складаються з трьох чи більше глюкозних одиниць, таких як декстрини, глікоген, крохмаль та ін. [1]. Здатність до синтезу α -амілаз виявлено у мікроорганізмів, у тканинах рослин, комах та тварин [2, 3]. Однак у промисловості перевагу надають саме продуцентам мікробного походження завдяки наявності у них фізико-хімічних властивостей, важливих для промисловості, їхній широкій субстратній специфічності, високій продуктивності та легкості маніпулювання з ними. На сьогодні мікробні α -амілази майже повністю витіснили хімічний

гідроліз у процесах перероблення крохмалю [2–4]. Їх широко застосовують у харчовій, спиртовій, текстильній, паперовій промисловості, пивоварінні та медицині. Так, α -амілази, які активні в кислій ділянці рН, використовують у виробництві глюкозних сиропів, у лужній — як добавки до мийних засобів [2, 3, 5]. Отже, для різних галузей промисловості потрібні ензими з конкретними характеристиками специфічності, стабільності, активності за певних значень рН і температури. Тому пошук нових продуцентів α -амілаз залишається актуальною галуззю досліджень.

Оскільки можливості практичного використання ензимів зумовлені їхньою здатністю гідролізувати різні субстрати, метою роботи було вивчення субстратної специфічності α -амілаз двох продуцентів — *Aspergillus flavus* var. *oryzae* і *Bacillus subtilis* та дослідження стійкості їх до низки хімічно активних речовин.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були позаклітинні α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147, вирощені на рідкому живильному середовищі Чапека з крохмалем такого складу (г/л): NaNO_3 — 1 (*A. flavus* var. *oryzae* 80428) чи 2 (*B. subtilis* 147); KH_2PO_4 — 1; KCl — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,015; нерозчинний картопляний крохмаль — 10 (*A. flavus* var. *oryzae* 80428) чи 1 (*B. subtilis* 147); соєва мука — 10 (*B. subtilis* 147); H_2O — до 1 л; pH 6,0 [6]. Культивування мікроорганізмів на цих середовищах проводили глибинним способом в 0,75 л колбах Ерленмеєра на качалках зі швидкістю обертання 220 об/хв за температури 24 °C (*A. flavus* var. *oryzae* 80428) і 42 °C (*B. subtilis* 147) протягом 5 і 3 діб, відповідно. Біомасу відділяли фільтруванням через чотири шари марлі (*A. flavus* var. *oryzae* 80428) або центрифугуванням при 5 000 г протягом 30 хв (*B. subtilis* 147). У супернатанті культуральної рідини визначали вміст протеїну й амілолітичну активність. Методи виділення й очищення α -амілаз описано раніше [6]. Вони включали гель-фільтрацію на нейтральному TSK-гелі — Toyopearl HW-50 (Toyo Soda, Японія), іонообмінну хроматографію на гелі DEAE-Toyopearl 650 M (Toyo Soda, Японія) під час очищення α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428, а також було використано метод афінної сорбції на крохмалі у разі α -амілази *B. subtilis* 147.

Амілолітичну активність визначали ДСК-методом, що ґрунтується на виявленні вільних альдегідних груп у молекулах моно- і олігосахаридів, які при окисненні до карбоксильної групи в лужних умовах здатні відновлювати 3,5-динітросаліцилову кислоту (ДСК) до 3-аміно-5-нітросаліцилової кислоти, спричинюючи зміну жовтогарячого забарвлення на червоне. Метод з ДСК, який уперше запропонував Miller, використовували з деякими модифікаціями згідно з Кубрак [7]. Суміш для визначення активності, яка містила 0,25 мл 1%-го розчину крохмалю та 1/15 М фосфатний буфер (pH 6,0), нагрівали за температури 40 °C протягом 5 хв. Для побудови калібрувального графіка паралельно з дослідними пробами як стандарт готували 10 проб з різною кількістю 1%-го розчину перекристалізованої глюкози. У попередньо нагріті дослідні проби вносили розчин препарату ензиму в такій кількості, щоб його загальний об'єм з буфером становив 0,25 мл, та інкубували за температури 40 °C упродовж 30 хв. Після цього в усі проби додавали 0,75 мл ДСК-реагенту

(1% -й розчин 3,5-динітросаліцилової кислоти в 1%-му розчині гідроксиду натрію). Проби інкубували протягом 5 хв на киплячій водяній бані (100 °C). Забарвлення утвореної 3-аміно-5-нітросаліцилової кислоти додатково стабілізували внесенням 0,25 мл 40%-го розчину калію-натрію тартрату. Проби охолоджували протягом 3 хв у льодяній бані й визначали їхню оптичну густину на СФ-26 за довжини хвилі 575 нм. Концентрацію редукуючих моносахаридів у дослідних пробах визначали за рівнянням регресії, яке відображало лінійну залежність між значеннями оптичної густини всіх точок калібрувального графіка і концентрацією глюкози (як стандарту редукуючих цукрів) у дослідних пробах. Активність α -амілази обчислювали за формулою:

$$A_{\text{KT}} = \frac{C_{\text{RC}} \cdot V_{\text{пр}}}{1 \cdot V_{\text{преп}} \cdot [\text{протеїн}]}$$

де C_{RC} — концентрація редукуючих цукрів у пробах згідно з калібрувальним графіком, мкг;

$V_{\text{пр}}$ — загальний об'єм проби, мл (1,5 мл);

t — час реакції гідролізу крохмалю, хв (30 хв);

$V_{\text{преп}}$ — об'єм ензимного препарату, мл;

[протеїн] — концентрація загального протеїну в ензимному препараті, мг/мл.

За одиницю активності α -амілази, визначену цим методом, приймали кількість редукуючих цукрів (мкг), утворених за 1 хв за даних умов. Питому активність виражали у перерахунку на 1 мг загального протеїну (Од/мг протеїну).

Субстратну специфічність α -амілаз визначали, використовуючи такі субстрати: мальтозу, сахарозу, трегалозу, декстрин, α - і β -циклодекстрин, амілозу, амілопектин, глікоген, пулулан, розчинний і нерозчинний картопляний крохмаль, пшеничний і кукурудзяний крохмаль, декстрин 500. Розчини субстратів готували в концентрації 1% з додаванням 10 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH 6,0). Активність α -амілази оцінювали ДСК-методом за стандартних умов, як зазначено вище. Відносну активність виражали у %, за 100% приймали активність α -амілази під час розщеплення як субстрату розчинного картопляного крохмалю.

Кінетичні параметри α -амілаз — уявну константу Міхаеліса (K_m , мг/мл) та максимальну швидкість реакції (V_{max} , мкг⁻¹·хв·мг), визначали за графіками Лайнуївера-Берка на розчинному картопляному крохмалі, декстрині та глікогені за температури 40 °C

і рН 6,0. При цьому інкубаційне середовище в усіх експериментах містило однакову кількість α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147 (3,3 Од/мг протеїну і 5,1 Од/мг протеїну, відповідно).

Вплив різних хімічно активних речовин аналізували в процесі інкубації препаратів α -амілази протягом 30 хв за кімнатної температури в 1/15 М фосфатному буфері (рН 4,7 і 6,0) у присутності таких реагентів: 1) аніонних детергентів — додецилсульфату натрію в концентрації 0,001 М, 0,005 М, 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М та дезоксихолевої кислоти в концентрації 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1,0%; 2) неіоногенних детергентів — Тритону Х-100 і Твін-80 у концентрації 0,1%, 0,5%, 1,0%, 5,0%, 10,0% (об'єм/об'єм); 3) денатуранту — сечовини в концентрації 0,005 М, 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,5 М, 1,0 М, 2,0 М, 4,0 М, 8,0 М; в) окисника — перексиду водню в концентрації 0,001 М, 0,005 М, 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,5 М. Амілолітичну активність визначали йодометричним методом відповідно до ГОСТу 20264.4-89 [8].

Усі досліди проводили у 5–8 повторях. Аналіз одержаних результатів здійснювали шляхом статистичної обробки методами варіаційної і кореляційної статистики з використанням *t*-критерію Стюдента [8]. У роботі вираховували середні значення величин і стандартні похибки ($M \pm m$). Як достовірні розглядали значення $P < 0,05$. Результати, що подані графічно, отримували за допомогою програми Microsoft Excel 2003.

Результати та обговорення

Важливим питанням, необхідним для розуміння можливості практичного застосування ензимів, є вивчення їхньої субстратної специфічності та кінетичних параметрів дії.

Вивчення субстратної специфічності α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147 до 15 субстратів показало (рис. 1, 2), що ці ензими здатні розщеплювати всі види крохмалю, причому α -амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 найефективніше розщеплює розчинний картопляний і пшеничний крохмаль, а α -амілаза *B. subtilis* 147 — пшеничний крохмаль.

За ефективністю гідролізу α -амілазою *A. flavus* var. *oryzae* 80428 досліджені субстрати можна розташувати у такій послідовності: розчинний картопляний крохмаль (100%) → пшеничний крохмаль (97,5%) → нерозчинний картопляний крохмаль (90%) → кукурудзяний крохмаль (85%) → амілопектин (48,5%) → глікоген (45,4%) → амілоза (43%) → декстрин (40%) → β -циклодекстрин

(28%) → сахароза (9%) → пулулан (3,6%). Цей ензим взагалі не гідролізує α -циклодекстрин, мальтозу, трегалозу, декстран 500.

Дещо інша картина спостерігається за розщеплення вищезазначених субстратів α -амілазою *B. subtilis* 147: найефективніше вона гідролізує пшеничний крохмаль (162%) → кукурудзяний крохмаль (111%) → амілозу (110%) → розчинний картопляний крохмаль (100%) → нерозчинний картопляний крохмаль, глікоген (98%) → декстрин (72%) → амілопектин (23%) → трегалозу (19%) → β -циклодекстрин (13%). α -Амілаза *B. subtilis*

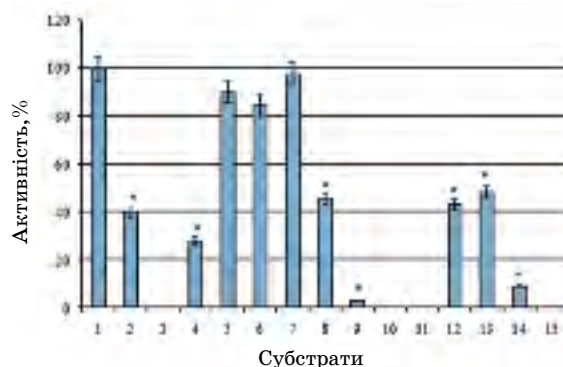


Рис. 1. Субстратна специфічність α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428:

1 — розчинний картопляний крохмаль (контроль); 2 — декстрин; 3 — α -циклодекстрин; 4 — β -циклодекстрин; 5 — нерозчинний картопляний крохмаль; 6 — кукурудзяний крохмаль; 7 — пшеничний крохмаль; 8 — глікоген; 9 — пулулан; 10 — мальтоза; 11 — трегалоза; 12 — амілоза; 13 — амілопектин; 14 — сахароза; 15 — декстран 500

* Достовірно відмінне від контрольного значення за $P < 0,05$

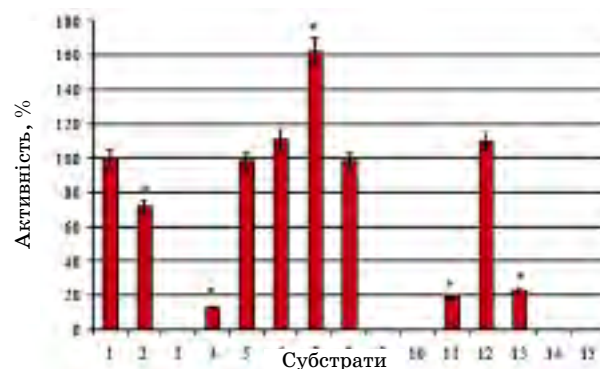


Рис. 2. Субстратна специфічність α -амілази *B. subtilis* 147:

1 — розчинний картопляний крохмаль (контроль); 2 — декстрин; 3 — α -циклодекстрин; 4 — β -циклодекстрин; 5 — нерозчинний картопляний крохмаль; 6 — кукурудзяний крохмаль; 7 — пшеничний крохмаль; 8 — глікоген; 9 — пулулан; 10 — мальтоза; 11 — трегалоза; 12 — амілоза; 13 — амілопектин; 14 — сахароза; 15 — декстран 500

* Достовірно відмінне від контрольного значення за $P < 0,05$

lis 147 не розщеплює α -циклодекстрин, пулулан, мальтозу, декстран 500.

Аналогічні дані отримали й інші дослідники [2], які показали, що α -амілаза *Penicillium citrinum* HBF62 також ефективно розщеплювала розчинний картопляний крохмаль (100%), пшеничний крохмаль (111%), кукурудзяний крохмаль (80%) та глікоген (99%), трохи гірше — амілозу (56%). α -Амілаза *Geobacillus thermoleovorans* здатна активно діяти на різні види крохмалю: розчинний картопляний (100%), рисовий (98%), кукурудзяний (81%), пшеничний (87%), гірше — на амілопектин (66%) та пулулан (41%), але не здатна розщепити β -циклодекстрин [9]. α -Амілаза *B. mojavensis* A21 та *B. amyloliquefaciens*, як і досліджувана нами α -амілаза *B. subtilis* 147, ефективно гідролізували амілозу (117% і 120% відповідно) та картопляний крохмаль (100% і 95% відповідно) [10, 11]. α -Амілаза *Trichoderma harzianum*, навпаки, найкраще розщеплювала амілопектин (450%) і глікоген (274%), однак, як і досліджені нами α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147, не здатна до гідролізу α -циклодекстрину [12].

Отже, α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147 виявляють широкую субстратну специфічність, демонструючи здатність ефективно гідролізувати як розгалужені (крохмаль, глікоген, амілопектин), так і лінійні (амілоза) глюкани. Однак α -амілази обох продуцентів не здатні розщеплювати або незначною мірою розщеплюють циклічні глюкани (α - і β -циклодекстрин відповідно). Крім того, α -амілаза *B. subtilis* 147 удвічі швидше гідролізує амілозу та глікоген, ніж α -амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428.

Вивчення кінетичних параметрів α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147 здійснювали згідно з кінетикою Міхаеліса–Ментен [13]. Уявну константу Міхаеліса (K_m , мг/мл), яка відображає ступінь спорідненості ензиму до субстрату, та максимальну швидкість реакції (V_{max}) α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 (рис. 3–5) та *B. subtilis* 147 (рис. 6–8) визначали за графіками Лайнуївера–Берка на розчинному картопляному крохмалі, декстрині та глікогені. Вибір цих субстратів пов'язаний з їхньою здатністю розчинятись у воді.

K_m і V_{max} за розщеплення розчинного картопляного крохмалю α -амілазою *A. flavus* var. *oryzae* становили 4,17 мг/мл і 6,67 мкг⁻¹·хв·мг, декстрин — 1,0 мг/мл і 2,86 мкг⁻¹·хв·мг, глікогену — 0,43 мг/мл і 1,0 мкг⁻¹·хв·мг, відповідно (рис. 3–5).

Схожі значення K_m під час розщеплення розчинного крохмалю спостерігали в α -амілаз *Thermoactinomyces thalophilus* KSV 17 (5,20 мг/мл) [14], *Bacillus* sp. GRE1 (4,98 мг/мл) [15], *Geobacillus thermodenitrificans* (3,05 мг/мл) [16].

Вивчення кінетичних параметрів α -амілази *B. subtilis* 147 показало, що K_m і V_{max} під час розщеплення нею розчинного картопляного крохмалю становили 0,40 мг/мл

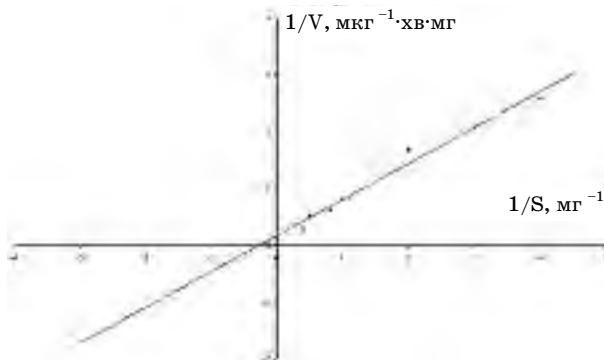


Рис. 3. Залежність оберненої швидкості гідролізу розчинного картопляного крохмалю α -амілазою *A. flavus* var. *oryzae* 80428 від його оберненої концентрації

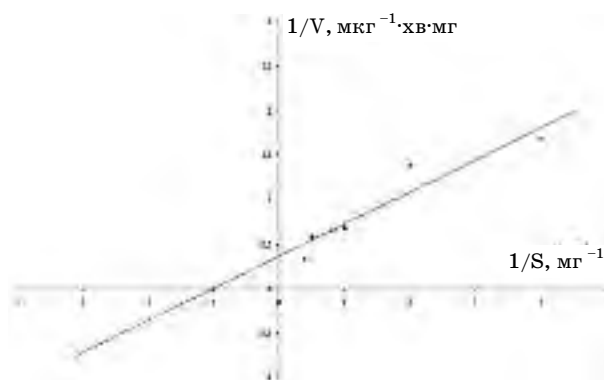


Рис. 4. Графік Лайнуївера–Берка гідролізу декстрину α -амілазою *A. flavus* var. *oryzae* 80428 залежно від його концентрації

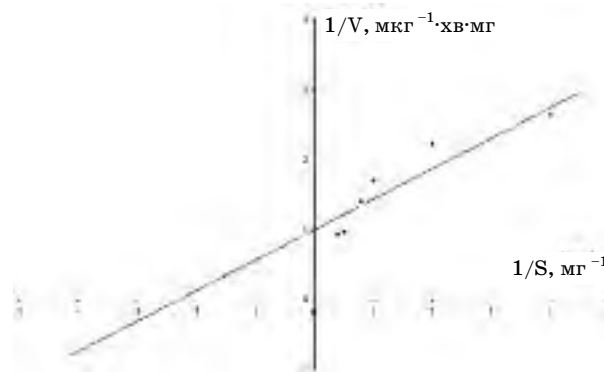


Рис. 5. Залежність оберненої швидкості гідролізу глікогену α -амілазою *A. flavus* var. *oryzae* 80428 від його оберненої концентрації

і $5,26 \text{ мкг}^{-1} \cdot \text{хв} \cdot \text{мг}$, декстрину — $0,63 \text{ мг/мл}$ і $1,25 \text{ мкг}^{-1} \cdot \text{хв} \cdot \text{мг}$, глікогену — $0,26 \text{ мг/мл}$ і $10,60 \text{ мкг}^{-1} \cdot \text{хв} \cdot \text{мг}$ (рис. 6–8). Подібні значення константи Міхаеліса за розщеплення розчинного крохмалю були характерними для α -амілаз *Penicillium camemberti* PL21 — $0,92 \text{ мг/мл}$ [17], *Thermobifida fusca* — $0,88 \text{ мг/мл}$ [18], *B. subtilis* KCX 006 — $0,29 \text{ мг/мл}$ [19], *B. cohnii* US147 — $0,70 \text{ мг/мл}$ [20].

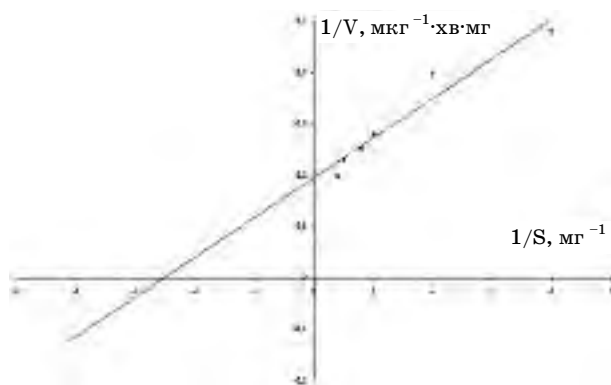


Рис. 6. Графік Лайнуївера–Берка гідролізу розчинного картопляного крохмалю α -амілазою *B. subtilis* 147 залежно від його концентрації

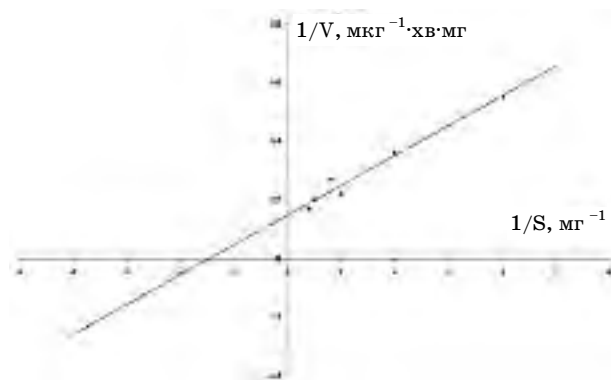


Рис. 7. Залежність оберненої швидкості гідролізу декстрину α -амілазою *B. subtilis* 147 від його оберненої концентрації

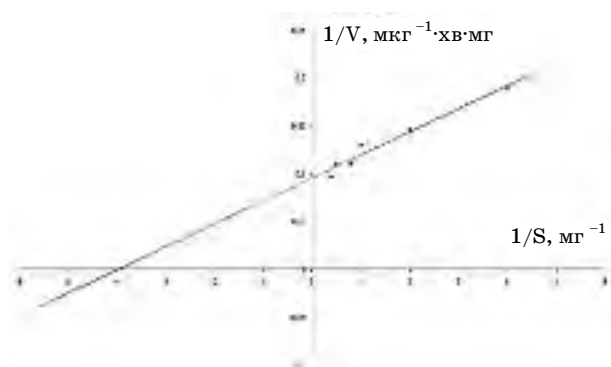


Рис. 8. Графік Лайнуївера–Берка гідролізу глікогену α -амілазою *B. subtilis* 147 залежно від його концентрації

Максимальну швидкість реакції $6,67 \text{ мкг}^{-1} \cdot \text{хв} \cdot \text{мг}$ спостерігали за розщеплення α -амілазою *A. flavus* var. *oryzae* 80428 розчинного картопляного крохмалю, тимчасом як у випадку α -амілази *B. subtilis* 147 максимальна швидкість реакції $10,60 \text{ мкг}^{-1} \cdot \text{хв} \cdot \text{мг}$ відзначалася за гідролізу глікогену.

Отже, вивчення кінетичних параметрів α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147 на різних субстратах показало, що обидва ензими виявляють найвищу афінність до глікогену, оскільки саме на цьому субстраті спостерігаються найнижчі значення K_m . α -Амілаза *T. harzianum* також виявляла більшу спорідненість до глікогену, ніж до розчинного картопляного крохмалю, однак її K_m за розщеплення глікогену становила $4,50 \text{ мг/мл}$, а розчинного крохмалю — $6,53 \text{ мг/мл}$ [12].

Деякі дослідники вважають, що різниця в значеннях K_m і V_{max} різних ензимів зумовлена структурою субстрату та умовами реакції [21]. Крім того, на швидкість гідролізу субстратів може впливати розмір молекул субстрату, а також кількісний вміст різних типів глікозидних зв'язків: α -1,4 і α -1,6. Встановлено [2], що субстрати з переважним вмістом α -1,4-глікозидних зв'язків розщеплюватимуться набагато швидше, ніж ті, що містять більше α -1,6-глікозидних зв'язків.

Окрім субстратної специфічності, важливою властивістю α -амілаз, яка визначає використання їх у різних галузях промисловості, є стійкість до агресивних речовин, таких як детергенти, сурфактанти, окисники, що часто входять до складу екологічно безпечних мийних засобів. Тому вважали за доцільне перевірити вплив деяких із них на активність α -амілаз.

Вплив додецилсульфату натрію (ДСН) на активність α -амілаз

ДСН — це аніонна поверхнево-активна речовина (ПАР), що використовується у виробництві мийних засобів, шампунів, зубних паст, косметики для утворення піни, а також за електрофорезу для денатурації молекул протеїнів. Існують дані щодо здатності амінокислот протеїнів утворювати комплекси з аніонними, катіонними та неіоногенними ПАР [22]. Так, ДСН здатен утворювати асоціати з лізином [22].

За даними літератури, ДСН є активним інгібітором α -амілаз, оскільки пригнічує їхню активність навіть у дуже низьких концентраціях. Так, у концентрації $0,1\%$ ДСН спричинює зниження активності α -амілази *G. thermoleovorans* на 30% [9]. α -Амілаза

P. citrinum HBF62 після 30 хв інкубування з 5 мМ ДСН зберігала 38%, а з 10 мМ — 35% активності [2]. α -Амілаза *B. amyloliquefaciens* виявилася чутливою до ДСН, оскільки втрачала 70% вихідної активності у присутності 5 мМ ДСН та 88% за концентрації ДСН 10 мМ [11]. Існує думка, що термостабільні ензими є резистентними до дії органічних розчинників та детергентів [9, 23]. Прикладом цього може бути α -амілаза *Bacillus* sp. BKL20, яка виявилася повністю стабільною у присутності ДСН в концентрації до 10 мМ та зберігала 64% активності у присутності 100 мМ ДСН після 30 хв інкубації [7], а α -амілаза *Bacillus* sp. A3-15 після 30 хв інкубування з 1% ДСН втрачала лише 18% своєї активності [23]. Однак цьому твердженню суперечать отримані нами дані щодо майже повної втрати активності термостабільною α -амілазою *B. subtilis* 147 навіть у присутності 1 мМ ДСН (рис. 9). Подібні дані було одержано в разі додавання 2–10 мМ ДСН до α -амілази *B. aquimaris* VITP4, коли ензим виявився взагалі нестійким до дії ДСН [24].

Вивчення впливу ДСН на активність α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 показало, що цей ензим зберігав 69% своєї активності у присутності 1 мМ розчину даного детергенту та 19% — 5 мМ розчину після 30 хв інкубації (рис. 9). α -Амілаза *P. citrinum* HBF62 після 30 хв інкубування з 1 мМ ДСН зберігала 89% активності [2], α -амілаза *B. mojavensis* A21 через 1 год інкубування з 1% ДСН ($\approx$ 3 мМ) — 71% своєї активності [10], α -амілаза *B. cohnii* US147 у присутності 1 мМ ДСН через 15 хв інкубування зберігала 85% вихідної активності [20], а α -амілаза *Wangia* sp. C52 з додаванням 5 мМ ДСН втрачала 41% своєї активності через 10 хв інкубування [25]. Отже, α -амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 є досить конкурентоздатною

щодо чутливості до ДСН порівняно з вище-описаними ензимами.

Вплив сечовини на активність α -амілаз

Відомо, що більшість α -амілаз є досить чутливими до дії сечовини [26].

Дослідження α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147 свідчать про їхню високу стійкість до сечовини, оскільки з додаванням 8 М розчину цієї сполуки вони зберігали 86,5% та 97% своєї активності, відповідно, навіть після 30 хв інкубування (рис. 10). Крім того, α -амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 виявилася повністю стабільною у присутності 5 мМ — 4 М сечовини, як і α -амілаза *B. subtilis* 147 за концентрації сечовини 5 мМ. У разі додавання 10 мМ — 2 М сечовини α -амілаза *B. subtilis* 147 зберігала 75–87,5% своєї активності та є повністю стійкою за додавання 4 М і 8 М денатуранту. За низьких концентрацій невеликі полярні молекули сечовини можуть вбудовуватися між пептидними ланцюгами, розриваючи водневі зв'язки, що призводить до зменшення стабільності молекули ензиму. Водночас за високих концентрацій молекули сечовини не здатні проникати в молекули ензиму, а містяться лише на її поверхні, змінюючи гідрофобність.

Більш високу стабільність α -амілази *B. subtilis* 147 за високих концентрацій сечовини (від 4 до 8 М) можна пояснити тим, що невеликі полярні молекули не спроможні регулювати її здатність впливати на гідрофобність усієї молекули ензиму, тимчасом як, на відміну від досліджених нами ензимів, α -амілаза *Bacillus* sp. DM-15 через 30 хв інкубування у присутності 8 М сечовини зберігала 67% своєї активності [27], α -амілаза *Bacillus* sp. BKL20 — 42% [7], α -амілаза *Bacillus* sp. A3-15 — лише 20% [23], а α -амілази

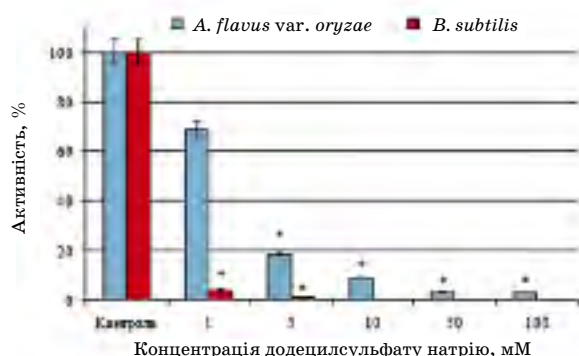


Рис. 9. Вплив додецилсульфату натрію на активність α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147.

* Достовірно відмінне від контрольного значення за $P < 0,05$

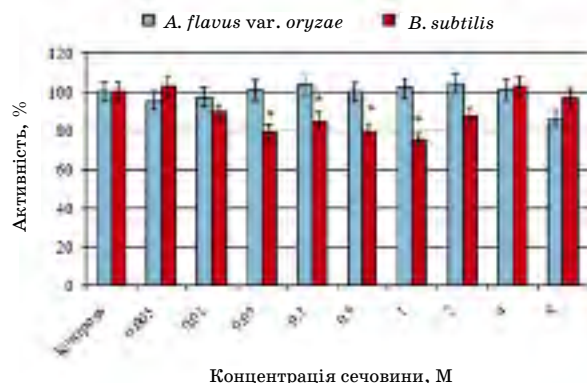


Рис. 10. Вплив сечовини на активність α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147.

* Достовірно відмінне від контрольного значення за $P < 0,05$

з алкалофільних штамів *Bacillus* — повністю втрачали свою активність [28]. Окрім того, сечовина навіть у низькій концентрації — 5 і 10 мМ — спричинювала зниження активності α -амілази *B. amyloliquefaciens* на 42% і 84%, відповідно [11], тоді як α -амілаза *P. citrinum* HB62 була повністю стійкою у присутності 1–10 мМ сечовини, яка сприяє навіть незначному (10–12%) стимулюванню активності ензиму [2].

Вплив дезоксихолевої кислоти на активність α -амілаз

Вивчення впливу іншого аніонного детергенту — дезоксихолевої кислоти показало, що вона не впливала на активність α -амілази *B. subtilis* 147 у концентрації 0,05%–0,5%, а підвищення її концентрації до рівня 1% зумовлювало незначне (15%) зниження активності ензиму. α -Амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 повністю зберігала активність у присутності 0,05–1% дезоксихолевої кислоти після 30 хв інкубування навіть з незначним підвищенням її на 13% за концентрації поверхнево-активної речовини 0,05% і 0,1% (рис. 11). Подібні результати було отримано для α -амілази *G. thermoleovorans*, у якої 1%-на холінова кислота викликала підвищення активності на 20% [9]. Одержані нами результати збігаються з даними Кубрак [7], яка показала, що α -амілаза *Bacillus* sp. BKL20 зберігала 79% активності у присутності 50 мМ дезоксихолевої кислоти та 72,5% з додаванням 100 мМ детергенту після 30 хв інкубування.

Таким чином, α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147 виявилися дуже стійкими до дії дезоксихолевої кислоти.

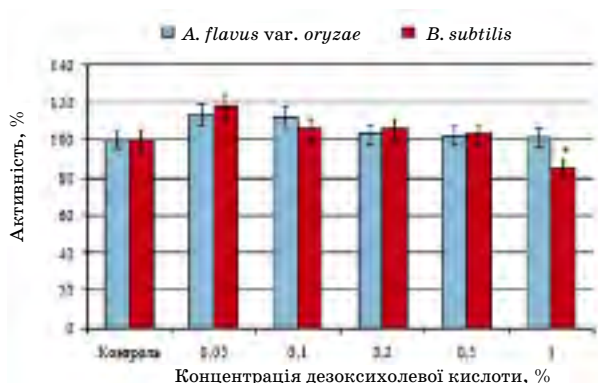


Рис. 11. Вплив дезоксихолевої кислоти на активність α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147.

* Достовірно відмінне від контрольного значення за $P < 0,05$

Вплив Тритону X-100 та Твіну-80 на активність α -амілаз

Тритон X-100 і Твін-80 належать до неіоногенних детергентів, які входять до складу деяких мийних та косметичних засобів. Відомо, що вони здатні по-різному впливати на активність одних і тих самих ензимів, виділених з подібних мікроорганізмів [29].

Вивчення впливу неіоногенних сурфактантів (об'єм/об'єм) на активність α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147 показало (рис. 12, 13), що ці ензими виявляли високу стійкість до вищезазначених сполук. Тритон X-100 не справляв інгібуючого впливу на активність α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147, спостерігалася навіть їх активація на 12% та 100%, відповідно, у присутності 10%-го розчину Тритону X-100 після 30 хв інкубування (рис. 12). Подібні результати були одержані Кубрак для α -амілази *Bacillus* sp. BKL20 [7], Vano та ін. [30] для α -амілази *B. subtilis* KIBGE-HAS, де ступінь активації Тритоном X-100 (5%) становив 85%. Стійкою до дії цього сурфактанта була й α -амілаза *A. acidocaldarius* [26]. Однак у випадку α -амілази *G. thermoleovorans* спостерігалася пригнічення активності ензиму на 20% та 40%,

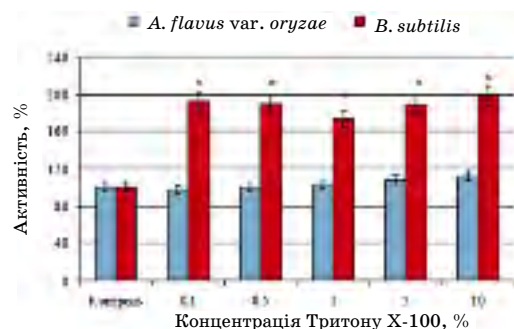


Рис. 12. Вплив Тритону X-100 на активність α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147.

* Достовірно відмінне від контрольного значення за $P < 0,05$

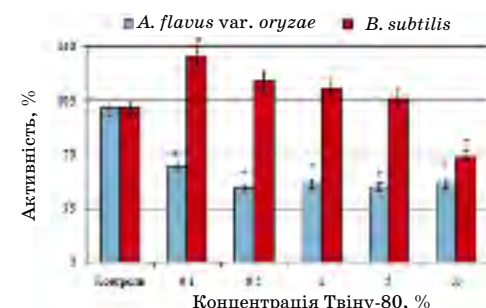


Рис. 13. Вплив Твіну-80 на активність α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147.

* Достовірно відмінне від контрольного значення за $P < 0,05$

відповідно, у присутності 0,1% і 0,2% Тритону X-100 після 1 год інкубування [9]. Інгібуючий вплив цього детергента спостерігався і в разі α -амілази *B. mojavensis* A21, активність якої знижувалася на 17% з додаванням 5% Тритону X-100 після 1 год інкубування [10]. α -Амілаза *Rhizobium* sp. INPA R-926 у присутності 1% - та 2% -х його розчинів зберігала 86% своєї активності [29].

Дещо інші результати одержали під впливом Твіну-80. α -Амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 виявилася більш чутливою до дії цього детергента, ніж α -амілаза *B. subtilis* 147, оскільки за концентрації 0,1% зберігала 60% активності, а від 0,5% до 10% Твіну-80 — лише половину активності. Водночас активність α -амілази *B. subtilis* 147 підвищувалася на 6% — 34% за цієї самої концентрації детергента, і лише 10% -й Твін-80 спричинював зниження активності на 31% (рис. 13). Однак це пригнічення активності було нижчим, ніж у випадку α -амілази *B. subtilis* KIBGE-HAS, яка втрачала 29% і 49% своєї активності у присутності 5% та 10% Твіну-80, відповідно [30]. α -Амілази *Rhizobium* sp. INPA R-926 та *Bradyrhizobium* sp. INPA R-991 також повністю зберігали свою активність у присутності 1% - та 2% -х розчинів цього детергенту, навіть спостерігалось незначне підвищення їхньої активності [29]. Як й у випадку α -амілази *B. subtilis* 147, активність *G. thermoleovorans* підвищувалась у присутності 0,1% і 0,2% Твіну-80 [9].

Зниження активності α -амілаз під дією Твіну-80 пов'язують з переважним вмістом у його складі олеїнової кислоти. Крім того, інгібування може бути результатом спільної дії таких чинників, як зниження гідрофобної взаємодії, що відіграє ключову роль у підтриманні третинної структури протеїну, та пряма взаємодія з його молекулою [30].

Вплив перексиду водню на активність α -амілаз

Пероксид водню — дуже сильний хімічний окисник, який додають до складу мийних засобів. Тому потенційною умовою використання ензимів у процесі виготовлення екологічно безпечних мийних засобів є їхня стійкість до хімічного окиснення.

α -Амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147 є стійкими до хімічного окиснення перексидом водню (рис. 14). Так, α -амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 повністю зберігала свою активність у присутності 0,001 — 0,05 М перексиду водню, зі зростанням концентрації окисника до 0,1 М і 0,5 М спостерігалось дуже незначне зниження

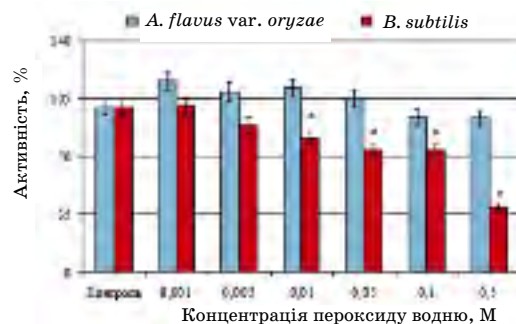


Рис. 14. Вплив перексиду водню на активність α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147.

* Достовірно відмінне від контрольного значення за $P < 0,05$

рівня активності — на 6% і 7% відповідно. α -Амілаза *B. subtilis* 147 також виявилася достатньо стійкою до дії перексиду водню і зберігала 89% — 74% активності за його концентрації 0,005 М — 0,1 М, зростання ж концентрації цієї речовини до 0,5 М зумовлювало зниження активності ензиму на 61%. Подібні результати були отримані для α -амілази *Bacillus* sp. BKL20, яка у разі додавання 0,5 М перексиду водню після 30 хв інкубування зберігала 24% своєї активності, а в присутності 1–10 мМ окисника була повністю стабільною [7]. На противагу отриманим даним, α -амілаза *Bacillus* sp. PN5 втрачала 30% своєї активності у присутності лише 5 мМ перексиду водню після 1 год інкубування [31]. А α -амілаза *B. cohnii* US147 з додаванням 1 мМ окисника після 15 хв інкубування зберігала 77% активності [20]. Є дані щодо α -амілази *Bacillus* KSM-K38, яка зберігає активність у присутності 1,8 М перексиду водню, однак цей ензим є менш термостабільним порівняно з α -амілазою *B. subtilis* 147 [32].

Таким чином, здатність α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147 ефективно розщеплювати як розгалужені, так і лінійні крохмалевмісні субстрати й витримувати високі концентрації неіоногенних та аніонних детергентів, денатурант (сечовини) та окисника (перексиду водню), уможливить у майбутньому використання цих ензимів у різних галузях промисловості, де переробляють крохмалевмісну сировину, передусім у виробництві мийних засобів.

Висловлюємо подяку співробітникам відділів антибіотиків (к. б. н. Сафронів Л. А.) і фізіології та систематики мікроміцетів (д. б. н. Ждановій Н. М., к. б. н. Курченко І. М., к. б. н. Харкевич О. С.) за надані для дослідження штами мікроорганізмів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Anto H., Trivedi U., Patel K. Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation // Food Technol. Biotechnol. — 2006. — V. 44, N 2. — P. 241–245.
2. Metin K., Koc U., Ateslier Z. B. B., Biyik H. H. Purification and characterization of α -amylase produced by *Penicillium citrinum* HBF62 // Afr. J. Biotechnol. — 2010. — V. 9, N 45. — P. 7692–7701.
3. Mojsov K. Microbial alpha-amylases and their industrial applications: a review // Int. J. Manag. IT Engin. — 2012. — V. 2, N 10. — P. 583–609.
4. Talekar S., Patil J. Production and characterization of thermostable alpha amylase by *Bacillus stearothermophilus* NCIM 2922 // J. Cell Tissue Res. — 2012. — V. 12, N 1. — P. 3037–3042.
5. Das S., Singh S., Sharma V., Soni M. L. Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme // Int. J. Pharm. Sci. — 2011. — V. 2, Is. 1. — P. 486–496.
6. Авдюк Е. В., Варбанец Л. Д., Сафронова Л. А., Харкевич Е. С. Очистка α -амилаз *Aspergillus flavus* var. *oryzae* и *Bacillus subtilis* и их свойства // Біотехнологія. — 2012. — Т. 5, № 5. — С. 91–99.
7. Kubrak O. I., Storey J. M., Storey K. B., Lushchak V. I. Production and properties of α -amylase from *Bacillus* sp. BKL20 // Can. J. Microbiol. — 2010. — V. 56, N 4. — P. 279–288.
8. Варбанець Л. Д., Борзова Н. В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження // К.: Наук. думка, 2010. — 440 с.
9. Uma Maheswar Rao J. L., Satyanarayana T. Purification and characterization of a hyperthermostable and high maltogenic α -amylase of an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2007. — V. 142, N 2. — P. 179–193.
10. Hmidet N., Maalej H., Haddar A., Nasri M. A novel α -amylase from *Bacillus mojavensis* A21: purification and biochemical characterization // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2010. — V. 162, Is. 4. — P. 1018–1030.
11. Gangadharan D., Nampoothiri K. M., Sivaramakrishnan S., Pandey A. Biochemical characterization of raw-starch-digesting alpha amylase purified from *Bacillus amyloliquefaciens* // Ibid. — 2008. — V. 158, Is. 3. — P. 653–662.
12. Mohamed S. A., Azhar E. I., Ba-Akdah M. M. et al. Production, purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma harzianum* grown on mandarin peel // AJMR. — 2011. — V. 5, N 9. — P. 1018–1028.
13. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты (том 1). — М.: Мир, 1982. — 195 с.
14. Sreenivasa Rao K., Ellaiah P., Karnakumar Biradar V. Purification and characterization of thermostable amylase from a strain of *Thermoactinomyces thalophilus* KSV 17 // RGUHS J. Pharm. Sci. — 2012. — V. 2, Is. 1. — P. 83–89.
15. Gulelat Haki D., Alfredo Anceno J., Sudip Rakshit K. Atypical Ca^{2+} -independent, raw-starch hydrolyzing α -amylase from *Bacillus* sp. GRE1: characterization and gene isolation // World J. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V. 24, N 11. — P. 2517–2524.
16. Ezeji T. C., Bahl H. Purification, characterization, and synergistic action of phytate-resistant α -amylase and α -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10 // J. Biotechnol. — 2006. — V. 125, N 1. — P. 27–38.
17. Nouadri T., Meraihi Z., Shahrazed D.-D., Leila B. Purification and characterization of the α -amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21 // Afr. J. Biotechnol. Resear. — 2010. — V. 4, N 6. — P. 155–162.
18. Yang C.-H., Liu W.-H. Purification and properties of a maltotriose-producing α -amylase from *Thermobifida fusca* // Enz. Microb. Technol. — 2004. — V. 35, N 2–3. — P. 254–260.
19. Amutha K., Jaya Priya K. Effect of pH, temperature and metal ions on amylase activity from *Bacillus subtilis* KCX 006 // Int. J. Pharm. Bio Sci. — 2011. — V. 2, Is. 2. — P. 407–413.
20. Ghorbel R. E., Maktouf S., Massoud E. B. et al. New thermostable amylase from *Bacillus cohnii* US147 with a broad pH applicability // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2008. — V. 157, N 1. — P. 50–60.
21. Ikram-ul-Haq, Javed M. M., Hameed U., Adnan F. Kinetics and thermodynamic studies of alpha amylase from *Bacillus licheniformis* mutant // Pak. J. Bot. — 2010. — V. 42, N 5. — P. 3507–3516.
22. Гермашева И. И., Глухарёва Н. А., Прохорова Г. В. Взаимодействие L-лизина с додецилсульфатом натрия // Научн. вед. БелГУ. — 2011. — Т. 14, № 3. — С. 174–178.
23. Arian B. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15 // Bioresour. Technol. — 2008. — V. 99, N 8. — P. 3071–3076.
24. Anupama A., Jayaraman G. Detergent stable, halotolerant α -amylase from *Bacillus aquimaris* VITP4 exhibits reversible unfolding // Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol. — 2011. — V. 2, Is. 2. — P. 366–376.
25. Liu J., Zhang Z., Dang H. et al. Isolation and characterization of a cold-active amylase from marine *Wangia* sp. C52 // Afr. J. Microbiol. Res. — 2011. — V. 5, N 10. — P. 1156–1162.
26. Satheesh Kumar G., Subhosh Chandra M., Mallaiha K. V. et al. Purification and characterization of highly thermostable α -amylase from thermophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* // Biotechnol. Bioproc. Eng. — 2010. — V. 15, N 3. — P. 435–440.
27. Ozean B. D., Baylan M., Ozean N., Tekdal D. Characterization of thermostable α -amylase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate DM-15 // Res. J. Biol. Sci. — 2010. — V. 5, N 1. — P. 118–124.
28. Koki H. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 1999. — V. 63, N 4. — P. 735–750.
29. Oliveira A. N., Oliveira L.A., Andrade J. S. Partial characterization of amylases of two indigenous central amazonian rhizobia strains

- ins // Braz. Arch. Biol. Technol. — 2010. — V. 53, N 1. — P. 35–45.
30. Bano S., Qader S. A. U., Aman A., Azhar A. Partial purification and some properties of α -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS // Ind. J. Biochem. Biophys. — 2009. — V. 46, N 5. — P. 401–404.
31. Saxena R. K., Dutt K., Agarwal L., Nayyar P. A highly thermostable and alkaline amylase from

- a *Bacillus* sp. PN5 // Bioresour. Technol. — 2007. — V. 98, N 2. — P. 260–265.
32. Hagihara H., Igarashi K., Hayashi Y. et al. Novel α -amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38 // Appl. Environ. Microbiol. — 2001. — V. 67, N 4. — P. 1744–1750.

**α -АМИЛАЗЫ *Aspergillus flavus* var. *oryzae*
И *Bacillus subtilis*: СУБСТРАТНАЯ
СПЕЦИФИЧНОСТЬ И УСТОЙЧИВОСТЬ
К РЯДУ ХИМИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

Е. В. Авдюк, Л. Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии
НАН Украины, Киев

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Изучена способность α -амилаз двух продуцентов — *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 и *Bacillus subtilis* 147 расщеплять разные углеводсодержащие субстраты, такие как мальтоза, сахароза, трегалоза, декстрин, α - и β -циклодекстрин, амилоза, амилопектин, гликоген, пуллулан, растворимый картофельный, нерастворимый картофельный, кукурузный, пшеничный крахмалы, декстран 500. Показано, что исследованные энзимы отличаются по субстратной специфичности. α -Амилаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 эффективнее гидролизует растворимый картофельный и пшеничный крахмалы, в то время как α -амилаза *B. subtilis* 147 — только пшеничный. Энзимы обоих продуцентов не расщепляют мальтозу, α -циклодекстрин и декстран 500. Очень низкая способность гидролизовать пуллулан обнаружена у α -амилазы *A. flavus* var. *oryzae* 80428, а α -амилаза *B. subtilis* 147 вообще не действует на него. Самые низкие значения константы Михаэлиса для обоих энзимов получены при расщеплении гликогена, что свидетельствует о наибольшей аффинности именно к этому субстрату. Изучение влияния химически активных веществ на активность исследуемых энзимов показало, что α -амилазы *A. flavus* var. *oryzae* 80428 и *B. subtilis* 147 устойчивы к мочеvine, дезоксихолевой кислоте, Твину-80, Тритону X-100 и пероксида водорода, т. е. они являются конкурентоспособными с ранее описанными энзимами. Это даст возможность в будущем использовать данные энзимы в разных отраслях промышленности, прежде всего при изготовлении моющих средств.

Ключевые слова: *Aspergillus flavus* var. *oryzae*, *Bacillus subtilis*, α -амилаза, субстратная специфичность, константа Михаэлиса.

**α -AMYLASES OF *Aspergillus flavus* var. *oryzae*
AND *Bacillus subtilis*: THE SUBSTRATE
SPECIFICITY AND RESISTANCE
TO A NUMBER OF CHEMICALLY ACTIVE
SUBSTANCES**

K. V. Avdiuk, L. D. Varbanets

Institute of Microbiology and Virology of
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiyv

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

The ability of *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 and *Bacillus subtilis* 147 α -amylases to split different carbohydrate-containing substrates, such as maltose, sucrose, trehalose, dextrin, α - and β -cyclodextrin, amylose, amylopectin, glycogen, pullulan, soluble starch, insoluble starch, corn starch, wheat starch, dextran 500 has been studied. It was shown that investigated enzymes differ by substrate specificity. α -Amylase of *A. flavus* var. *oryzae* 80428 rapidly hydrolysed soluble potato and wheat starch, while the α -amylase of *B. subtilis* 147 did only wheat starch. Both enzymes don't cleave maltose, α -cyclodextrin and dextran 500. *A. flavus* var. *oryzae* 80428 α -amylase display very small ability to hydrolyze pullulan, while α -amylase of *B. subtilis* 147 it does not act in general. The lowest values of Michaelis constant for both enzymes at splitting of glycogen have been obtained, indicating that enzymes have the greatest affinity to this substrate. The studies of influence of chemically active substances on activity of *A. flavus* var. *oryzae* 80428 and *B. subtilis* 147 α -amylases show there are resistant to urea, deoxycholic acid, Tween-80, Triton X-100 and hydrogen peroxide. It's indicate the enzymes tested may be competitive in compare with earlier described in literature enzymes. The obtained results give a possibility to propose in future usage these enzymes in different fields of industry, foremost in detergent industry.

Key words: *Aspergillus flavus* var. *oryzae*, *Bacillus subtilis*, α -amylase, substrate specificity, Michaelis constant.