

УДК 579.852.11.222

**Л.Д. Варбанець<sup>1</sup>, К.В. Авдіюк<sup>1</sup>, Н.В. Борзова<sup>1</sup>, О.С. Харкевич<sup>1</sup>,  
Н.М. Жданова<sup>1</sup>, І.Й. Сейфулліна<sup>2</sup>, О.Е. Марцинко<sup>2</sup>, О.Г. Песарогло<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

<sup>2</sup>Одеський національний університет ім. І.І. Мечнікова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65029, Україна

## ВЛАСТИВОСТІ $\alpha$ -АМІЛАЗИ *ASPERGILLUS SP. 55*

*Вивчено вплив різних факторів на процес біосинтезу позаклітинної  $\alpha$ -амілази у *Aspergillus sp.* при глибинному культивуванні. Підібрано оптимальний склад поживного середовища: концентрація вуглецю (картопляний крохмаль 1 г/л) та азоту ( $\text{NaNO}_3$ , 0,5 г/л). Ферментний препарат має широкий рН-оптимум активності (4,5–9,0), термооптимум при рН 6,5 – 60 °С, а при рН 4,5 та при 9,0 – 50 °С. Показано інгібіторну дію координаційних сполук германію на амілолітичну активність препарату.*

*Ключові слова:*  $\alpha$ -амілаза, джерела азоту та вуглецю, термооптимум, рН-оптимум.

За інтенсивністю використання у різних галузях народного господарства провідне місце серед інших ферментів займають амілази, оскільки у багатьох виробничих процесах при обробці різноманітних видів сировини виникає необхідність у глибокому розщепленні крохмалю. Останніми роками при удосконаленні багатьох технологічних процесів широко використовуються амілази мікроорганізмів, які заміняють і витісняють амілази рослинного і тваринного походження. Використання амілаз мікроорганізмів у різноманітних технологічних процесах дозволяє зекономити значну кількість дуже дорогої харчової сировини. Поряд із цим значною перевагою амілаз мікроорганізмів є їх у сотні разів більша продуктивність, порівняно з рослинами і тваринами, дешевизна і доступність мікробіологічної сировини. Значною перевагою амілаз мікроорганізмів є також їх більш висока активність, широка специфічність, а також наявність таких унікальних властивостей, як термофілія і кислотостійкість.

Відомо, що для отримання максимального виходу необхідного ферменту важливе значення має не лише вибір високоактивного продуцента, але і створення оптимальних умов культивування мікроорганізму, включаючи склад поживного середовища, вік засівної культури, температуру вирощування, рН середовища, режим аерації тощо.

Раніше [1], внаслідок скринінгу, серед представників різних груп мікроорганізмів був відібраний активний продуцент  $\alpha$ -амілази – *Bacillus sp.* і вивчені деякі його фізико-хімічні властивості. Оскільки серед відомих промислових продуцентів  $\alpha$ -амілази значною активністю характеризуються представники мікроміцетів, нами був проведений скринінг, внаслідок якого був відібраний найбільш активний штам серед представників роду *Aspergillus*.

Метою даної роботи було отримати активний препарат  $\alpha$ -амілази з *Aspergillus*, вивчити його фізико-хімічні властивості, підвищити активність шляхом оптимізації умов культивування, а також із застосуванням деяких сполук, здатних впливати як на біосинтез, так і на активність ферменту.

**Матеріали і методи.** Об'єктом дослідження слугував *Aspergillus sp. 55* з колекції культур відділу фізіології та систематики мікроміцетів ІМВ НАН України. Культуру вирощували в глибинних умовах на середовищі Чапека з 4 % крохмалю, при температурі 28 °С, рН 6,8. Фермент із культуральної рідини виділяли фракціонуванням сульфатом амонію © Л.Д. Варбанець, К.В. Авдіюк, Н.В. Борзова, О.С. Харкевич, Н.М. Жданова, І.Й. Сейфулліна, О.Е. Марцинко, О.Г. Песарогло, 2009

при різних ступенях насичення (від 30 до 90 %). До культуральної рідини додавали суху сіль до 30 %-го насичення під контролем рН. Суміш витримували протягом 2-х год при температурі 4°C, центрифугували при 5000 g впродовж 30 хв. Осад відкидали, до супернатанту додавали сульфат амонію до кінцевої концентрації 90 %. Суміш витримували 6 год при температурі 4°C, центрифугували у тих самих умовах. Осад збирали, розчиняли у трикратному об'ємі 3 М сульфату амонію. У такому вигляді ферментний препарат не втрачаючи активності може зберігатись тривалий час.

Вміст білка на всіх етапах очистки визначали за методом Lowry et al. [6]. Калібрувальну криву будували, використовуючи як стандарт бичачий сироватковий альбумін.

Амілолітичну активність визначали за ГОСТ 20264.4-89 [3]. За одиницю активності приймали таку кількість ферменту, яка за температури 37° С і рН 6,0 за 10 хв каталізує розщеплення до декстринів 1 г крохмалю.

Кількість прогідролізованого крохмалю (m) в грамах визначали за формулою:

$$m = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \cdot 0,1,$$

де  $D_1$  – оптична густина контрольного розчину,  $D_2$  – оптична густина досліджуваного розчину; 0,1 – кількість крохмалю, взята для дослідження в якості субстрату, г.

Питому активність ферменту визначали шляхом ділення кількості прогідролізованого крохмалю на мг білка.

При визначенні рН-оптимуму використовували 1/15 М фосфатний буфер із відповідними концентраціями  $H^+$  іонів.

Оптимізацію здійснювали, використовуючи як базове мінеральне середовище (г/л):  $NaNO_3$  – 2;  $KH_2PO_4$  – 1;  $KCl$  – 0,5;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5;  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 0,015; картопляний крохмаль – 40. Культуру *A. oryzae* вирощували в глибинних умовах у великих пробірках (50 мл) при температурі 28 °С протягом 5 діб.

Як джерела вуглецю використовували різні моно-, ди- і полісахариди, такі як глюкоза, рамноза, галактоза, маноза, фруктоза, сорбоза, ксилоза, арабіноза, трегалоза, рафіноза, лактоза, мальтоза, сахароза, сахарні спирти, маніт, інозит у концентрації 1 %, а також розчинний і нерозчинний картопляний крохмаль, кукурудзяний крохмаль, соєве борошно у різних концентраціях (0,1 %, 0,5 %).

Як джерела азоту (у концентрації 2 г/л) при оптимізації середовища за цим показником використовували пептон, нітрат натрію, нітрит натрію, сечовину, гліцин, сульфат амонію, хлорид амонію, ацетат амонію, карбонат амонію і суміш сульфату амонію з сечовиною (у співвідношенні 3:2).

Кількість біомаси оцінювали гравітаційним методом після її відділення від культуральної рідини центригуванням при 5000 g×30 хв, і наступним висушуванням у сушильній шафі до постійної маси при 100 °С.

Як ефектори були досліджені синтезовані раніше комплексні сполуки германію з відомими біолігандами у концентраціях 0,1 та 0,01 % (табл. 1), які були синтезовані раніше Сейфулліною І.Й. зі співавторами [4, 5]. Були використані як окремі біоліганди: оксиетилідендифосфонові (ОЕДФ), нікотинові (Nic) кислоти, нікотинамід (Nad) та пірацетам (Pam), так і комплекси германію з лимонною кислотою та нікотинамідом (Ge-лим-Nad), з лимонною та нікотиновою кислотами (Ge-лим-Nic)], з оксиетилідендифосфоновією кислотою (Ge-ОЕДФ), з лимонною ( $Ge(H_2Cit)_2$ ), з оксиетилідендифосфоновією та нікотиновою кислотами (Ge-ОЕДФ-Nic) та з оксиетилідендифосфоновією кислотою та пірацетамом (Ge-ОЕДФ- Pam).

Усі експерименти тричі повторювали. У таблицях наведено середні арифметичні величини; відхилення від середнього значення не перевищувало 5 %.

**Результати та їх обговорення.** Для часткової очистки  $\alpha$ -амілази *Aspergillus* sp. 55 використовували ступінчасте фракціонування білків із культуральної рідини сульфатом амонію (від 30 % до 90 %). Вивчення деяких фізико-хімічних властивостей отриманого ферментного препарату (рис. 1–4) показало, що він має широкий оптимум рН (4,5–9,0).  $\alpha$ -Амілазна активність препарату при рН 4,5 і 9,0 була максимальною при температурі

інкубації 50 °С, а при рН 6,5 – при температурі 60 °С. α-Амілазна активність при рН 4,5 була нестабільною при оптимальному значенні температури, оскільки через 24 год вона втрачала половину початкової активності, в той час як ферментативна активність при рН 6,5 і 9,0 стабільно зберігалася (100 %) навіть через 24 год. Такі кінетичні властивості можуть свідчити про наявність комплексу амілолітичних ферментів з різними кінетичними властивостями у культуральній рідині продуценту і це питання буде розв’язуватися нами надалі.

Таблиця 1

Досліджувані речовини	
Біоліганди	
1-окситетиліден-дифосфонова кислота (H <sub>4</sub> Oedph)	
Нікотинова кислота (Nic) Нікотинамід (Nad) Пірацетам (Pam)	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-end;"> <div style="text-align: center;"> <p>Nic</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Nad</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Pam</p> </div> </div>
Лимонна кислота (H <sub>4</sub> Citr)	
Координаційні сполуки	
Ge-ОЕДФ	H <sub>6</sub> [Ge(μ-OH)(μ-Oedph)] <sub>6</sub> · 6H <sub>2</sub> O
Ge-ОЕДФ-Nic	(HNic) <sub>6</sub> [Ge(μ-OH)(μ-Oedph)] <sub>6</sub> · 12H <sub>2</sub> O
Ge-ОЕДФ- Pam	(HPam) <sub>6</sub> [Ge(μ-OH)(μ-Oedph)] <sub>6</sub> · 6H <sub>2</sub> O
Ge-лимонна кислота	[Ge(H <sub>2</sub> Cit) <sub>2</sub> ]
Ge-лим- Nad	(H Nad) <sub>2</sub> [Ge(HCit) <sub>2</sub> ]
Ge-лим-Nic	(HNic) <sub>2</sub> [Ge(HCit) <sub>2</sub> ]

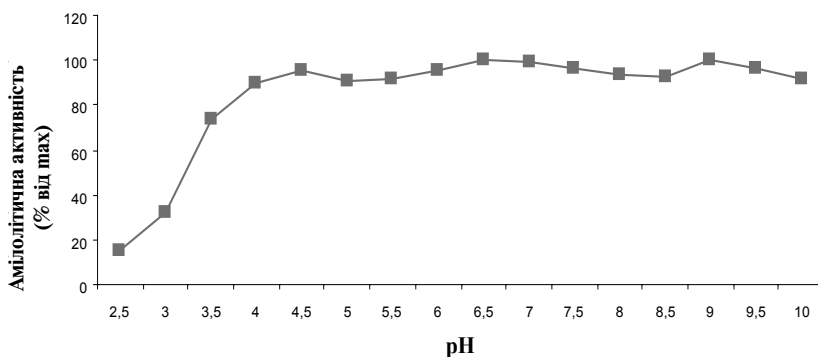


Рис. 1. Вплив рН на активність α-амілази *Aspergillus sp. 55*

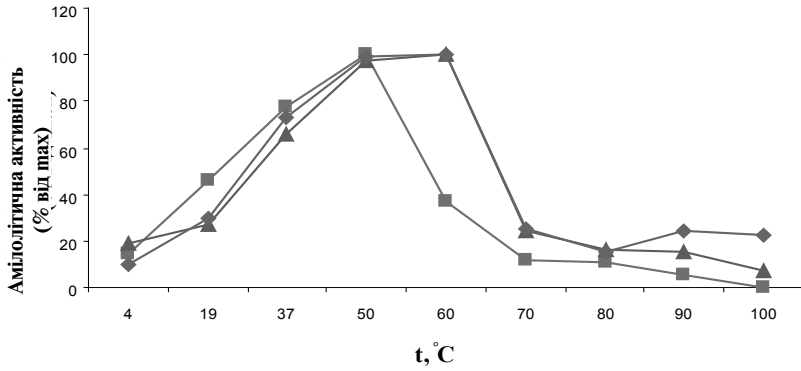


Рис. 2. Вплив температури на активність  $\alpha$ -амілази *Aspergillus* sp. 55: —■—  $\alpha$ -амілаза з рН<sub>опт</sub> 4,5, —▲—  $\alpha$ -амілаза з рН<sub>опт</sub> 6,5, —◆—  $\alpha$ -амілаза з рН<sub>опт</sub> 9,0

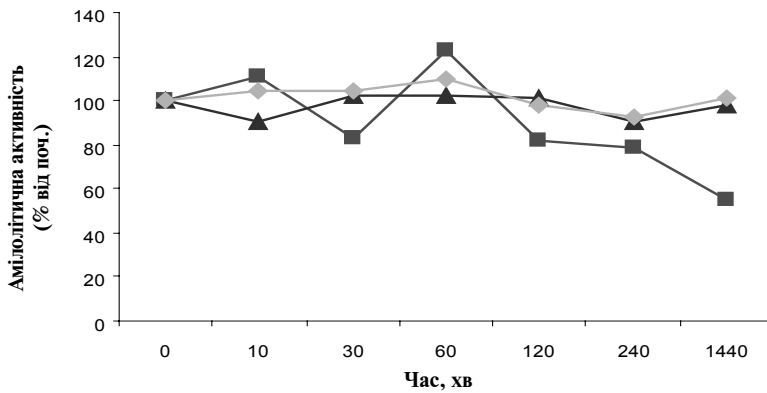


Рис. 3. Вплив рН на стабільність  $\alpha$ -амілази *Aspergillus* sp. 55: —■—  $\alpha$ -амілаза з рН<sub>опт</sub> 4,5, —▲—  $\alpha$ -амілаза з рН<sub>опт</sub> 6,5, —◆—  $\alpha$ -амілаза з рН<sub>опт</sub> 9,0

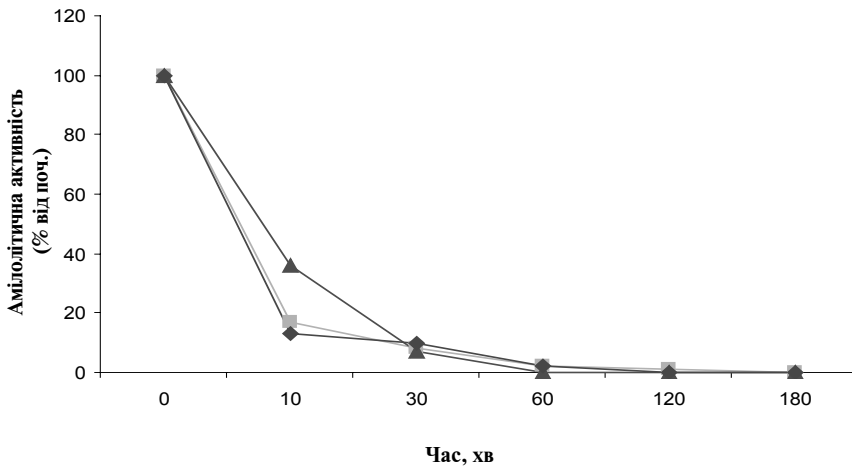
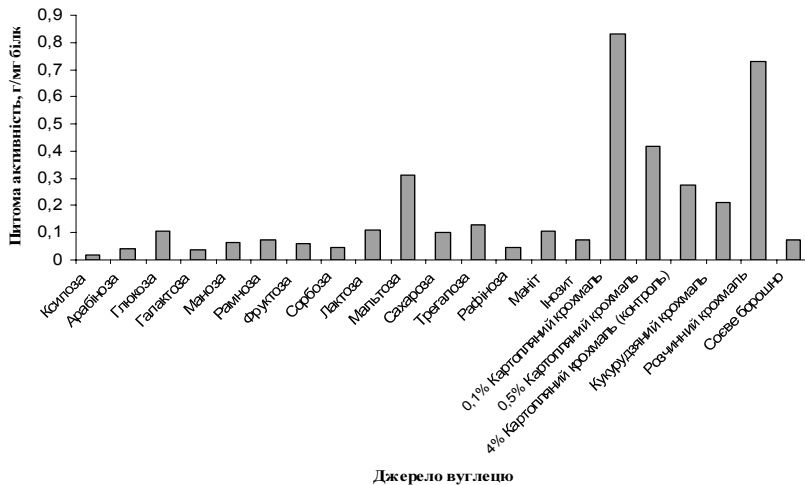


Рис. 4. Вплив температури на активність  $\alpha$ -амілази *Aspergillus* sp. 55: —■—  $\alpha$ -амілаза з рН<sub>опт</sub> 4,5, —▲—  $\alpha$ -амілаза з рН<sub>опт</sub> 6,5, —◆—  $\alpha$ -амілаза з рН<sub>опт</sub> 9,0

Одним із шляхів активації синтезу ферментів є оптимізація поживного середовища за джерелами вуглецевого і азотного живлення, а також відпрацювання умов культивування. Відомо, що вибірковість щодо джерел вуглецю і азоту в поживному середовищі є характерною видовою особливістю мікроорганізмів. Тому важливим етапом досліді-

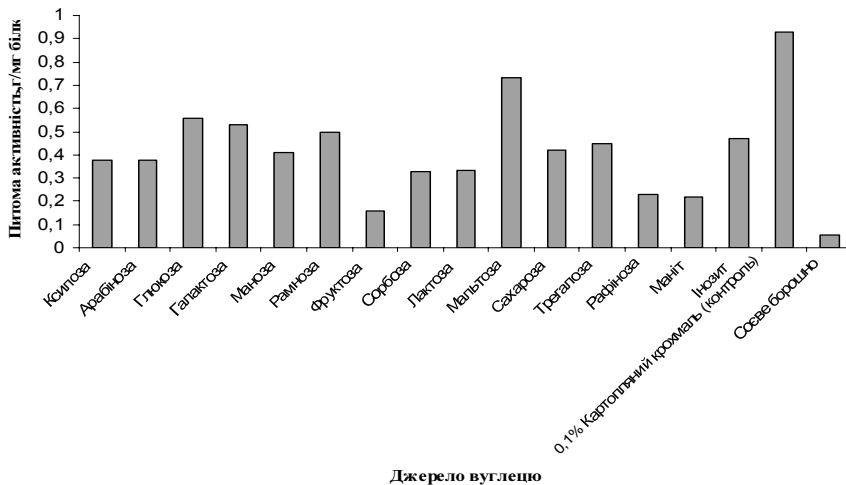
джен був підбір умов культивування продуценту *Aspergillus* sp. 55 для підвищення виходу  $\alpha$ -амілази.

Було встановлено, що найвищий рівень  $\alpha$ -амілазної активності у культуральній рідині спостерігався при використанні 0,1 % нерозчинного картопляного крохмалю, який викликав підвищення питомої амілолітичної активності ферменту в 3 рази порівняно з контролем (рис. 5).



**Рис. 5.** Вплив різних джерел вуглецю на синтез  $\alpha$ -амілази *Aspergillus* sp. 55 (контроль – 4 % нерозчинний картопляний крохмаль)

Вивчення впливу на продукцію  $\alpha$ -амілази як окремих вуглеводів (рис. 5), так і їх суміші з 0,1 % нерозчинним картопляним крохмалем (рис. 6) показало, що на середовищі з вуглеводами як єдиними джерелами вуглецю активність  $\alpha$ -амілази вища, ніж при використанні їх як додаткове джерело вуглецю.



**Рис. 6.** Вплив суміші 0,1% картопляного крохмалю з різними джерелами вуглецю на синтез  $\alpha$ -амілази *Aspergillus* sp. 55 (контроль – 0,1 % нерозчинний картопляний крохмаль)

Дані щодо впливу джерел азоту на  $\alpha$ -амілазну активність продуценту *Aspergillus* sp. 55 наведено на рис. 7. З отриманих даних видно, що на середовищі з нітратом натрію спостерігався найвищий рівень  $\alpha$ -амілазної активності і найкращий ріст.

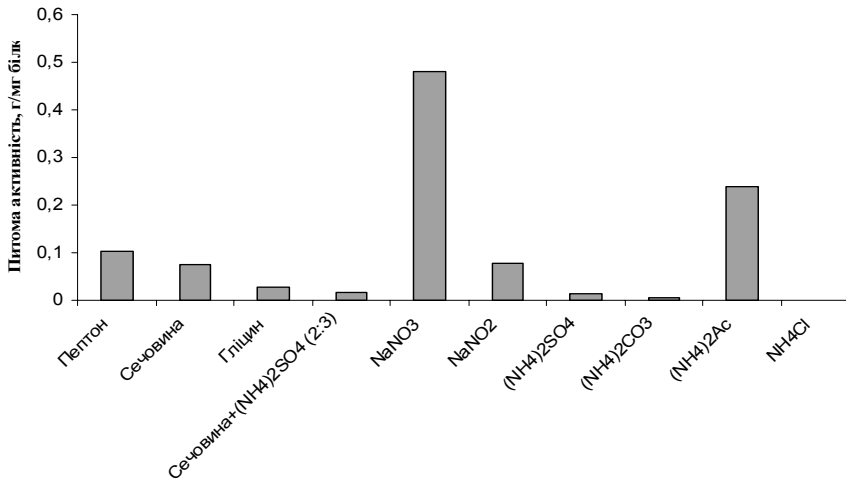


Рис. 7. Вплив різних джерел азоту на синтез  $\alpha$ -амілази культуурою *Aspergillus sp. 55*

На рис. 8 наведено результати впливу різних співвідношень вуглецю (нерозчинний картопляний крохмаль) і азоту ( $\text{NaNO}_3$ ) на синтез  $\alpha$ -амілази *Aspergillus sp. 55*. Було отримано такі результати: 1 г/л нерозчинного картопляного крохмалю і 0,5 г/л  $\text{NaNO}_3$  є оптимальними концентраціями в середовищі для продукування штамом найвищої активності  $\alpha$ -амілази.

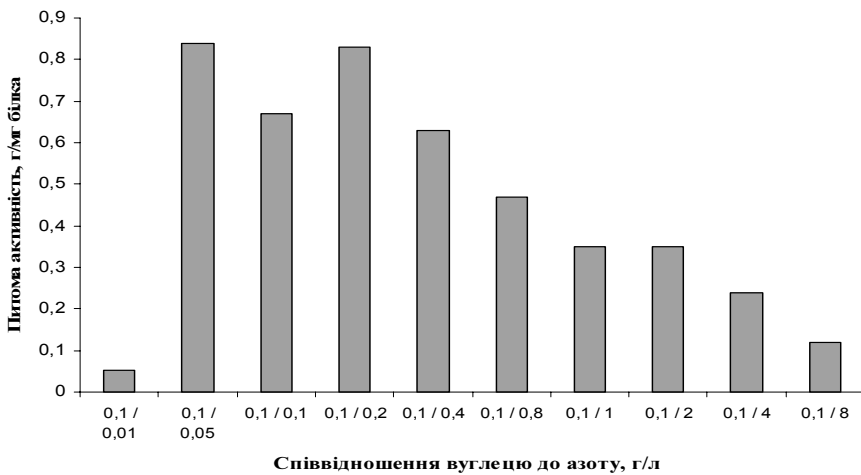


Рис. 8. Вплив різних співвідношень вуглецю і азоту на синтез  $\alpha$ -амілази *Aspergillus sp. 55*

Таким чином, одержані дані дозволяють зробити висновок про те, що оптимальним джерелом вуглецю для біосинтезу  $\alpha$ -амілази *Aspergillus sp. 55* є 0,1 % нерозчинний картопляний крохмаль. Нами був встановлений оптимальний склад поживного середовища (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 0,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;  $\text{KCl}$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,015; нерозчинний крохмаль – 1, при вирощуванні на якому активність  $\alpha$ -амілази у культуральній рідині *Aspergillus sp. 55* була підвищена у 3 рази порівняно з контролем.

Відомо, що деякі речовини здатні підвищувати активність ферментів. Так, раніше було показано, що деякі з похідних германію підвищували синтез і активність  $\alpha$ -галактозидази і  $\alpha$ -N-ацетилгалактозамінази *A. niger* і амілази *Bacillus subtilis* [2].

Вивчення впливу досліджених сполук на активність  $\alpha$ -амілази *Aspergillus sp. 55* (табл. 2) засвідчує, що більшість сполук германію є інгібіторами даного ферменту. Включення складають 0,01 % Pam, 0,01 % Nad, 0,01 % Nic, 0,01 % Ge-лим-Nad, які діють на рівні контролю.

Вплив різних сполук германію на активність  $\alpha$ -амілази *Aspergillus sp. 55*

Сполука, концентрація	Відносна активність, %
Контроль	100,0
Pam 0,01%	100,0
Pam 0,1%	96,0
Nad 0,01%	100,0
Nad 0,1%	96,0
Nic 0,01%	101,0
Nic 0,1%	32,0
Ge-лим-Nad 0,01%	100,0
Ge-лим-Nad 0,1%	6,0
Ge-лим-Nic 0,01%	97,5
Ge-лим-Nic 0,1%	0,85
Ge(H <sub>2</sub> Cit) <sub>2</sub> 0,01%	71,0
Ge(H <sub>2</sub> Cit) <sub>2</sub> 0,1%	26,0
Ge-ОЕДФ-Nic 0,01%	86,0
Ge-ОЕДФ-Nic 0,1%	12,0
Ge-ОЕДФ 0,01%	84,0
Ge-ОЕДФ 0,1%	4,0
Ge-ОЕДФ-Pam 0,01%	89,0
Ge-ОЕДФ-Pam 0,1%	10,0
ОЕДФ 0,01%	2,5
ОЕДФ 0,1%	16,0

Таким чином, внаслідок проведеної роботи було досліджено фізико-хімічні властивості  $\alpha$ -амілази *Aspergillus sp. 55*, встановлено оптимальний склад поживного середовища для даного продуцента, а також вивчено вплив деяких похідних германію на активність  $\alpha$ -амілази. Це дало змогу в 3 рази підвищити активність ферменту.

*Л.Д. Варбанец<sup>1</sup>, К.В. Авддюк<sup>1</sup>, Н.В. Борзова<sup>1</sup>, Е.С. Харкевич<sup>1</sup>, Н.Н. Жданова<sup>1</sup>, І.І. Сейфулліна<sup>2</sup>, Е.Э. Марцинко<sup>2</sup>, А.Г. Песарогло<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

<sup>2</sup>Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова

#### СВОЙСТВА $\alpha$ -АМИЛАЗЫ *ASPERGILLUS SP. 55*

#### Резюме

Изучено влияние разных факторов на процесс биосинтеза внеклеточной  $\alpha$ -амилазы у *Aspergillus sp. 55* при глубинном культивировании. Подобран оптимальный состав питательной среды: концентрация углерода (картофельный крахмал 1 г/л) и азота (NaNO<sub>3</sub>, 0,5 г/л). Ферментный препарат имеет широкий pH оптимум активности (4,5–9,0), термооптимум при pH 6,5 – 60 °C, а при pH 4,5 и при 9,0 – 50 °C. Показано ингибиторное действие координационных соединений германия на амилолитическую активность препарата.

Ключевые слова:  $\alpha$ -амилаза, источники азота и углерода, термооптимум, pH-оптимум.

*L.D. Varbanets<sup>1</sup>, K.V. Avdijuk<sup>1</sup>, N.V. Borzova<sup>1</sup>, E.S. Kharkevich<sup>1</sup>, N.N. Zhdanova<sup>1</sup>, I.I. Seifullina<sup>2</sup>, E.E. Martsinko<sup>2</sup>, A.G. Pesaroglo<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>2</sup>Mechnikov Odessa National University

#### PROPERTIES OF *ASPERGILLUS SP. 55* $\alpha$ -AMYLASE

#### Summary

The influence of different factors on biosynthesis of extracellular  $\alpha$ -amylase of *Aspergillus sp. 55* grown at submerged cultivation has been studied. The optimal composition of nutrient medium (1 g of starch and

0.5 g of NaNO<sub>3</sub> per 1 l) was chosen. The enzyme preparation has a wide pH optimum of activity (4.5–9.0), thermo optimum at pH 6.5 was 60°C, at pH 4.5 and 9.0 – 50°C. The inhibitory effect of coordinative germanium compounds on amylolytic activity of the preparation was shown.

The paper is presented in Ukrainian.

**Key words:**  $\alpha$ -amylase, carbon and nitrogen sources, thermo optimum, pH-optimum.

**The author's address:** *L.D. Varbanets*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St, Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. *Варбанець Л.Д., Мишак К.В., Мацелюх О.В., Гудзенко О.В., Сафронова Л.А., Приходько В.О.*  $\alpha$ -Амілази *Vacillus subtilis* // Мікробіол. журн. – 2006. – **68**, № 2. – С. 21–29.
2. *Варбанець Л.Д., Рзаєва О.Н., Авдіюк Е.В., Сейфулліна І.І., Марцінко Е.Э., Песарогло А.Г.* Влияние координационных соединений германия на активность ряда гликозидаз // Микробиол. журн. – 2007. – 69, № 3. – С. 11–19.
3. *ГОСТ 20264.4-89.* Препараты ферментные. Методы определения амилалитической активности // Изд-во стандартов. – 1989. – 17 с.
4. *Сейфулліна І.І., Марцінко Е.Э., Александров Г.Г., Сергиенко В.С.* Синтез, свойства и строение полиядерных оксмэтилиденфосфонатогерманатов; кристаллическая и молекулярная структура двух солей на их основе // Журн. неорган. химии. – 2004. – **49**, № 5. – С. 928–937.
5. *Сейфулліна І.І., Песарогло Л.Г., Марцінко Е.Э., Миначева Л.Х., Сергиенко В.С.* Бисцитратогерманатные комплексы с органическими катионами. Кристаллическая структура (HNic)<sub>2</sub>[Ge(HCit)<sub>2</sub>]<sub>3</sub>·3 H<sub>2</sub>O // Журн. неорган. химии. – 2006. – **51**, № 12. – С. 2010–2017.
6. *Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R.* Protein measurement with the Folin reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, N 1. – P. 265–275.

Отримано 17.11.2008