

УДК 577.152.34

ГРИБНІ АМІЛОЛІТИЧНІ ЕНЗИМИ ТА ЇХ ДІЯ НА НЕРОЗЧИННІ СУБСТРАТИ

Н. В. Борзова
О. В. Гудзенко
Л. Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

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

У результаті проведеного скринінгу виявлено активні штами з глюкоамілазною активністю серед представників мікроміцетів родів *Acremonium*, *Alternaria*, *Eupenicillium*, *Gliocladium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, однак найактивніші біосинтетики належали до родів *Aspergillus*, *Fusarium* та *Phoma*. Дослідження деяких умов культивування 4 штамів *Aspergillus* sp. показало, що оптимальними джерелами вуглецю під час глибинного культивування цих штамів є 2% -й картопляний або кукурудзяний крохмаль, а також комбінація 2% -го картопляного крохмалю з 1% -ю мальтозою. Проведено порівняння препаратів глюкоамілаз та амілаз у процесах оцукрення нерозчинних крохмалевмісних субстратів.

Ключові слова: глюкоамілаза, амілаза, скринінг, джерела вуглецю, гідроліз нерозчинних субстратів.

Проблема використання ензимів у сучасній промисловості й сільському господарстві вкрай важлива та актуальна, оскільки біокаталітичні процеси є високоефективними і відбуваються у м'яких умовах без утворення токсичних продуктів, і в багатьох випадках їх не можна замінити на традиційні каталітичні.

Технічні ензимні препарати незамінні як кормові добавки для сільськогосподарських тварин, при створенні харчових продуктів з новими властивостями і смаковими якостями, у процесі отримання екстрактивних речовин, у виробництві соків і спирту, в пивоварінні тощо. Підвищений інтерес саме до амілолітичних ензимів зумовлений широкими перспективами щодо використання їх у медицині, харчовій і легкій промисловості як ефективних та безпечних біокаталізаторів. В Україні на цей час випускають ензимні препарати з амілолітичною активністю — «Альфалад БТ» і «Альфалад БН» та один препарат з глюкоамілазною активністю — «Глюколад», які є досить активними, однак обсяги їх виробництва дуже обмежені і не можуть задовольнити дедалі зростаючих потреб вітчизняного ринку.

У зв'язку з вищезазначеним найбільш вагомими є роботи, спрямовані на створення промислових технологій отримання ефективних та недорогих вітчизняних біока-

талізаторів амілолітичної дії, що не поступаються за якістю світовим аналогам. Глюкоамілази та амілази, які є ключовими ензимами під час біоконверсії гідролізаторів крохмалю, належать до препаратів, які інтенсивно використовують у світі — виробництво їх становить декілька тисяч тонн на рік. Амілолітичні ензими найчастіше застосовують у процесах одержання патоки різного вуглеводного складу з крохмалевмісної сировини з наступним виробництвом глюкозно-фруктозних сиропів.

У сучасному крохмале-патоковому виробництві використовують виключно гомогенні технології переробки сировини — кислотні або ензиматичні. Утім, є досить ґрунтовні роботи [1], в яких доведено економічну доцільність заміни гомогенних технологій на гетерогенні, що дозволяє знизити затрати на 30%.

Глюкоамілаза (КФ 3.2.1.3, (α -1,4-глюкан глюкогідролаза), також відома як екзо-1,4- α -глюкозидаза або γ -амілаза, амілоглюкозидаза, лізосомальна α -глюкозидаза, кисла мальтаза, матулаза, розщеплює сирий та розчинний крохмаль з утворенням переважно глюкози і невеликої кількості декстринів. Глюкоамілаза каталізує послідовне відщеплення (α -1,4-зв'язаних кінцевих залишків D-глюкози з нередукувальних кінців субстрату, що супроводжується інверсією ано-

мерної конфігурації й утворенням β -глюкози. Більшість глюкоамілаз мають здатність гідролізувати α -1,6-глікозидні зв'язки, проте з меншою швидкістю, ніж α -1,4-зв'язок [2]. Характерною особливістю глюкоамілаз, на відміну від α -глюкозидаз, є здатність у десятки разів швидше гідролізувати високополімерний субстрат, ніж оліго- та дисахариди [3].

Зважаючи на вищевикладене, було проведено пошук нових активних біосинтетиків глюкоамілаз, перспективних до впровадження у біотехнологічне виробництво, оптимізацію живильного середовища найактивніших штамів, досліджено здатність мікроорганізмів різних таксономічних груп (бацил, грибів, дріжджів) до синтезу глюкоамілази. Мета роботи полягала в проведенні порівняння різних препаратів глюкоамілаз у комплексі з амілазами, що їх було виділено з бацил та грибів, на здатність до оцукрення крохмалевмісної сировини.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження слугували 587 штамів — представників різних таксономічних груп (бактерій — 20, дріжджів — 179, мікроміцетів — 238, а також 150 неідентифікованих штамів грибів). 437 культур було одержано з музею живих культур ІМВ НАН України, 150 штамів мікроміцетів виділили самостійно.

Культивування мікроорганізмів проводили глибинним способом на качалках у пробірках при 220 об/хв за умов: бацили — 1 добу, 42 °С, дріжджі — 2 доби, 26–28 °С, мікроміцети — 4–5 діб, 25 °С, 10 мл живильного середовища.

Мікроміцети вирощували на середовищі Чапека (г/л): NaNO_3 — 2, 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; картопляний нерозчинний крохмаль — 20.

Неідентифіковані мікроміцети було виділено із зернових культур, картоплі, кукурудзи, листя чаю, ягід полуниці, ґрунту і поверхні стін. Для їх вирощування використовували 7% -й сусло-агар.

Дослідження впливу віку культури та інокулюма на синтез глюкоамілази проводили на чотирьох штамів грибів: *Aspergillus* sp. 182ш, 9, 32, 59.

Культури вирощували в глибинних умовах за вказаних температур у колбах Ерленмеєра (500 мл) об'ємом 100 мл. Посівний матеріал у колби вносили концентрацією 5% об'єму живильного середовища.

Оптимізацію здійснювали з використанням середовища Чапека як базового з додаванням різних індукторів: картопляного крохмалю, кукурудзяного крохмалю, кукурудзяної муки, пшеничних висівок, сої, картопляного крохмалю з додаванням 1% -ї мальтози, кукурудзяного крохмалю з додаванням 1% -ї мальтози, а також пшеничних висівок без додавання іншого джерела азоту.

Визначення активності глюкоамілази (ГА) проводили за ГОСТ 20264.4-89 [4]. За одиницю активності приймали таку кількість ензиму, яка, діючи на нерозчинний крохмаль, при 37 °С в умовах досліду протягом 1 хв вивільняла 1 мкмоль глюкози.

Вміст протеїну на всіх етапах дослідження визначали за методом Lowry та співавт. [5]. Калібрувальну криву будували з використанням як стандарту бичачого сироваткового альбуміну.

Біомасу відділяли: для бацил — центрифугуванням при 5 000 об/хв; грибів і дріжджів — фільтруванням, в надосадовій рідині визначали глюкоамілазну активність.

Частково очищені препарати амілаз та глюкоамілаз було одержано з культуральної рідини продуцентів у результаті фракціонування сульфатом амонію при 30 та 90% насичення.

Гідроліз крохмалевмісної сировини здійснювали двоетапно [6]. Розварювання проводили при 86 °С у присутності α -амілази. Суспензію картопляного та кукурудзяного крохмалю (10 г/30 мл води) витримували 30 хв при 50 °С, рН 6,3, за постійного перемішування. Потім додавали препарат амілази з розрахунку 1,5 Е/г крохмалю. Проби витримували при 86 °С за постійного перемішування впродовж 3 год, після чого охолоджували до 32 °С. Клейстеризовану та розріджену суспензію змішували з розчином ГА в ацетатному буфері (рН 5,0) у співвідношенні 5:1 за об'ємом, з розрахунку 6 ЕГА на 1 г крохмалю. Гідроліз проводили протягом 40 хв, рН 5,3, при температурі 58 °С та за постійного перемішування. Аналогічним чином проводили оцукрення кукурудзяної та пшеничної муки, вміст крохмалю у якій приймали за 50%. Оцукрення кукурудзяного та пшеничного борошна за допомогою препаратів глюкоамілаз здійснювали протягом 3 год при 45 °С, рН 5,5.

Після завершення процесу оцукрення проби центрифугували 5 хв при 15 000 г. У супернатанті визначали загальну концентрацію цукрів фенол-сірчанним методом [7] та концентрацію глюкози глюкозооксидазно-пероксидазним методом [8]. Продукти

реакції визначали колориметричним методом за довжини хвилі 400 нм. Кількість глюкози знаходили за калібрувальним графіком.

Усі експерименти проводили у трьох повторах. У таблиці наведено середні арифметичні величини; відхилення від середнього значення не перевищувало 5%.

Результати та обговорення

У результаті проведеного скринінгу було досліджено понад 280 музейних штамів мікроміцетів 35 родів та 150 свіжовиділених неідентифікованих грибних штамів, 179 штамів дріжджів 11 родів і 13 штамів роду *Bacillus*. Аналіз отриманих результатів показав, що продуценти ГА переважають серед грибних культур *Acremonium* (*A. kiliense*), *Alternaria* (*A. alternata*), *Eupenicillium* (*E. erubescens*), *Gliocladium* (*G. solani*), *Myrothecium* (*M. verrucaria*, *M. roriculum*), *Penicillium* (*P. aolametzii*, *P. canescens*, *P. purpurogenum*, *P. varians*), *Rhizopus* (*R. oryzae*). Найбільш активними біосинтетиками виявилися представники родів *Aspergillus*, *Fusarium* та *Phoma* (таблиця), переважно видів *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Fusarium poae*, *F. heterosporum*, *F. javanicum*, *F. lactis*, *F. solani* var. *argilaceum*, *F. sambucinum*, *Phoma fimetii*.

Скринінг продуцентів глюкоамілази серед мікроміцетів

Родина мікроміцетів	Кількість досліджених штамів	Активні штамів, %	Діапазон глюкоамілазної активності, Од/мл
<i>Acremonium</i>	11	27	0,004–0,06
<i>Alternaria</i>	4	25	0,012
<i>Aspergillus</i>	43	28	0,03–0,147
<i>Fusarium</i>	49	39	0,1–0,139
<i>Penicillium</i>	45	16	0,013–0,04
<i>Phoma</i>	8	25	0,09–0,54
Unidentified	150	60	0,02–1,3
Усього	430	31	0,004–0,54

Примітка: $P \leq 0,05$.

Досліджувані свіжовиділені штамів із зернових і картоплі мали відносно високі показники активності порівняно зі штамів, виділеними з інших джерел та з музейними культурами. Ймовірно, це можна пояснити

адаптацією культур до субстрату, що містить специфічний індуктор (крохмаль), оскільки відомо, що амілази є індукцибельними ензимами. Однак, слід зазначити, що ці культури після нетривалого зберігання (протягом 2–3 місяців) майже повністю втратили глюкоамілазну активність. Серед дріжджів та бактерій нами взагалі не було виявлено жодного штаму з амілолітичною активністю.

Було досліджено вплив віку культури та інокулюма на синтез глюкоамілази чотирма штамів мікроміцетів: *Aspergillus* sp. — 182ш, 9, 32, 59. Ці штамів було відібрано за показниками високої глюкоамілазної активності та незначними коливаннями цих значень під час пересіву культури і залежно від сезону. Стабільність ензиматичної активності цих культур, на відміну від штамів роду *Phoma* та неідентифікованих штамів мікроміцетів, які мали вищі показники глюкоамілазної активності під час попереднього скринінгу, була основною підставою для вибору культур *Aspergillus* sp. для подальшої роботи. Встановлено, що для штамів 182ш та 9 оптимальним був вік культури 12–14 дб, а для штамів 32 і 59 — 5 та 15 дб (рис. 1). Засів рідкого середовища 5%-м інокулюмом (2- та 3-добовим) давав у підсумку найвищі показники за глюкоамілазною активністю у культуральній рідині всіх досліджуваних штамів у разі використання як джерела вуглецю кукурудзяного крохмалю або кукурудзяного борошна.

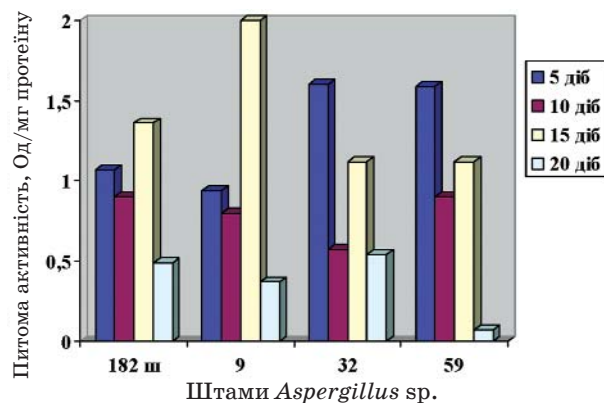


Рис. 1. Глюкоамілазна активність у культуральній рідині мікроміцетів залежно від віку культури (джерело вуглецю — кукурудзяний крохмаль)

Встановлено, що для різних штамів *Aspergillus* sp. оптимальні умови для синтезу глюкоамілази відрізняються. Так, для штаму *Aspergillus* sp. 9 такими були: засів 2–3 добовим інокулюмом (5%), 4-догова

ферментація, використання 2%-го картопляного або кукурудзяного крохмалю як джерела вуглецю. Глюкоамілазна активність у культуральній рідині за цих умов становила 1,42 Од/мг протеїну (рис. 2). Під час вирощування культури *Aspergillus* sp. 32 (рис. 3) максимальний рівень активності спостерігався на 3-тю добу глибинного культивування у присутності 2%-го картопляного крохмалю або комбінації 2%-го кукурудзяного крохмалю з 1%-ю мальтозою (активність 1,4 та 1,6 Од/мг протеїну відповідно). Вирощування *Aspergillus* sp. 59 на кукурудзяному крохмалі (2%) забезпечувало синтез глюкоамілази на рівні 1,44 Од/мг протеїну, що на 20–40% вище, ніж у разі використання картопляного крохмалю або мальтози (рис. 4). Найвищих показників за глюкоамілазною активністю в перерахунку на мл культуральної рідини для культури *Aspergillus* sp. 182ш було досягнуто на середовищі з висівками та мальтозою, однак за показниками питомої активності цей штам поступався першим трьом (рис. 5).

Для всіх чотирьох штамів грибів шляхом фракціонування сульфатом амонію отримали частково очищені ензимні препарати з глюкоамілазною активністю. Ці препарати було використано для гідролізу сирих крохмалевмісних субстратів. Поряд із глюкоамілазами в цій роботі використовували препарати α -амілази, одержані з культур *Bacillus* sp. та *Aspergillus* sp. Амілазні ензимні препарати з відносно невисокою оптимальною температурою дії, до яких належать глюкоамілази, доцільно застосовувати на стадії

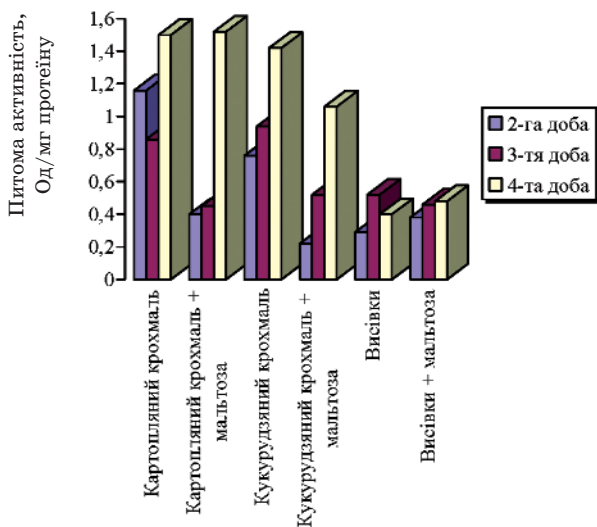


Рис. 2. Вплив деяких джерел вуглецю на біосинтез глюкоамілази культурою *Aspergillus* sp. 9 ($P \leq 0,05$)

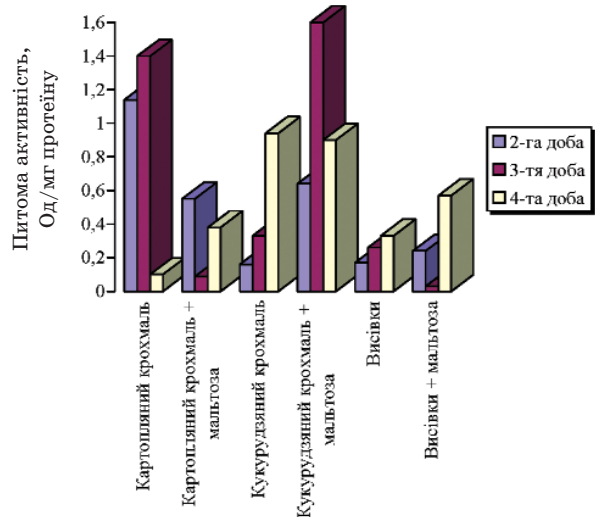


Рис. 3. Вплив деяких джерел вуглецю на біосинтез глюкоамілази культурою *Aspergillus* sp. 32 ($P \leq 0,05$)

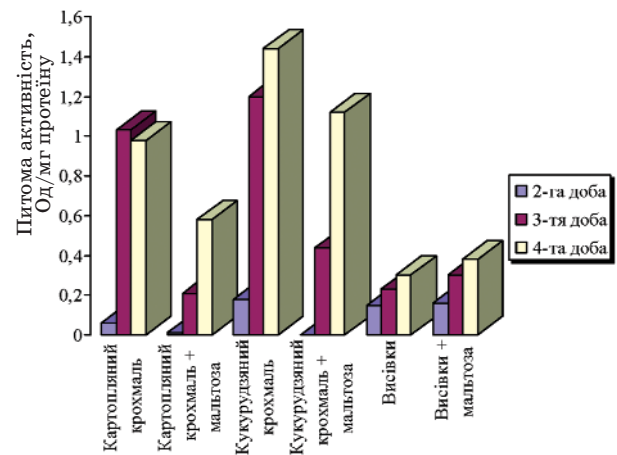


Рис. 4. Вплив деяких джерел вуглецю на біосинтез глюкоамілази культурою *Aspergillus* sp. 59 ($P \leq 0,05$)

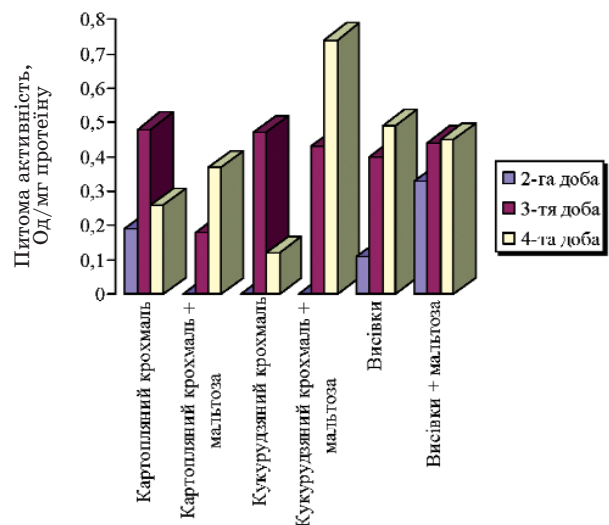


Рис. 5. Вплив деяких джерел вуглецю на біосинтез глюкоамілази культурою *Aspergillus* sp. 182ш ($P \leq 0,05$)

оцукрення сировини, тоді як термостабільні амілази забезпечують ефективний гідроліз на стадії розварювання. Унаслідок такого поєднання α -амілази та глюकोамілази ступінь гідролізу крохмалю може досягати 99%.

У процесі оцукрення муки або крохмалю на початковій стадії розварювання під дією препарату α -амілази спостерігається утворення олігомерних продуктів — мальтотріози, мальтотетрози, мальтопентози та мальтози. Додавання на стадії оцукрення препарату глюкоамілази дозволяє забезпечити майже повний гідроліз цих олігосахаридів до глюкози. Раніше повідомлялося [9], що використання високомолекулярних форм (понад 100 кДа) глюкоамілази, які несуть крохмальні зв'язувальні домен, дає змогу відмовитися від використання α -амілази на початковій стадії гідролізу сировини, оскільки такі глюкоамілази можуть ефективно атакувати нерозчинні субстрати, такі як пшеничне борошно або сирі крохмалі.

Нами було проведено порівняльне оцукрення кукурудзяного та картопляного крохмалю, а також кукурудзяного і пшеничного борошна за допомогою бактеріальної і грибною амілаз і трьох різних препаратів глюкоамілаз. Встановлено (рис. 6), що всі досліджувані препарати здатні досить ефективно оцукрювати запропоновані субстрати в умовах досліджу.

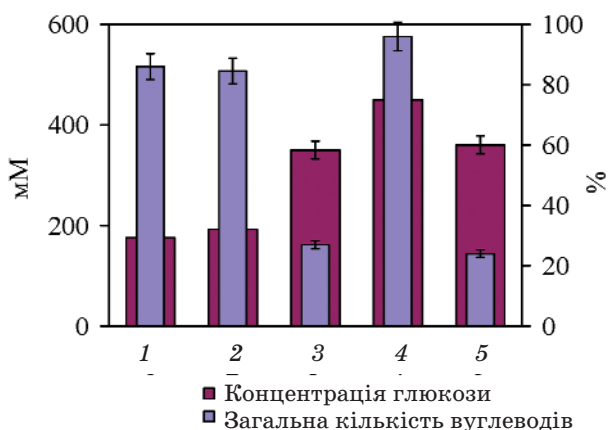


Рис. 6. Результати оцукрення різних субстратів за допомогою препаратів ГА та α -амілази:

- 1 — гідроліз кукурудзяного крохмалю α -амілазою *Bacillus* sp. 147 та ГА *Aspergillus* sp. 182ш;
 - 2 — гідроліз картопляного крохмалю α -амілазою *Bacillus* sp. 147 та ГА *Aspergillus* sp. 182ш;
 - 3 — гідроліз кукурудзяного борошна α -амілазою *Aspergillus* sp. 55 та ГА *Aspergillus* sp. 182ш;
 - 4 — гідроліз пшеничного борошна α -амілазою *Aspergillus* sp. 55 та ГА *Aspergillus* sp. 9;
 - 5 — гідроліз кукурудзяної муки ГА *Aspergillus* sp. 9.
- Загальну кількість вуглеводів виражено у відсотках від вихідної кількості нерозчинного субстрату.

Було показано, що найбільш перспективними є препарати глюкоамілази *Aspergillus* sp. 182ш та *Aspergillus* sp. 9, а також препарат грибною α -амілази. Слід зазначити, що під час гомогенного гідролізу кукурудзяного крохмалю протягом 3 год у присутності глюкоамілази *Aspergillus* sp. 59 вихід за глюкозою становив 24%. Найбільш повно гідроліз пшеничного борошна відбувався у присутності амілази *Aspergillus* sp. 55 та *Aspergillus* sp. 9. Хоча за показником виходу глюкози гомогенний гідроліз був досить ефективним, однак використання в одному процесі двох амілолітичних ензимів забезпечувало швидше й повне оцукрення крохмалю та борошна до розчинних олігосахаридів.

Таким чином, у результаті проведеного скринінгу виявлено активні штами з глюкоамілазною активністю серед представників мікроміцетів родів *Acremonium*, *Alternaria*, *Eupenicillium*, *Gliocladium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Rhizopus*. Найвищу глюкоамілазну активність було відзначено у культур, що належали до родів *Aspergillus*, *Fusarium* та *Phoma*, серед яких нами було виділено 4 найбільш перспективних штами. Ензимні препарати, виділені з культуральної рідини цих штамів, були здатні забезпечувати активний гідроліз нерозчинних субстратів як під час попереднього розварювання за допомогою α -амілази, так і в одностадійному процесі. Одержані результати допоможуть створити засади для впровадження нових ензимних препаратів у процеси перероблення крохмалевмісної сировини.

Висловлюємо подяку канд. біол. наук, ст. наук. співр. С. С. Нагорній за люб'язно надані для досліджень штами дріжджів; канд. біол. наук І. М. Курченко та докт. біол. наук., проф. Н. М. Ждановій за надані для досліджень штами мікроміцетів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Allen B. R., Charles M., Coughlin R. W. Fluidized-bed immobilized-enzyme reactor for the hydrolysis of cornstarch to glucose // *Biotechnol. Bioeng.* — 1979. — V. 21, N 4. — P. 689–706.
2. Pandey A., Nigam P., Soccol C. R. et al. Advances in microbial amylases // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 2000. — V. 31, N 2. — P. 135–152.
3. Грачева И. М., Кривова А. Ю. Технология ферментных препаратов. — 3-е изд., перераб. и доп. — М.: Элевар, 2000. — 512 с.
4. ГОСТ 20264.4-89. Препараты ферментные. Методы определения амилазной активности. — Изд-во стандартов. — 1989, 17 с.
5. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — V. 193, N 1. — P. 265–275.
6. Зоров И. Н., Семенова М. В., Цурикова Н. В., Синицын А. П. Гидролиз пшеничной муки под действием препаратов амилазы и индивидуальных ферментов // *Прикл. биохим. микробиол.* — 2006. — Т. 42, № 6. — С. 700–704.
7. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Anal. Chem.* — 1956. — V. 28, N 3. — P. 350–356.
8. Методы экспериментальной микологии / Под ред. В. И. Билай. — К.: Наук. думка, 1982. — 550 с.
9. Семенова М. В., Зоров И. Н., Синицын А. П. и др. Состав и свойства ферментного комплекса, секретируемого высокопродуктивными мутантными штаммами *Aspergillus awamori*, используемыми в спиртовой промышленности. / Сб. «Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК». — М.: ВНИИПТБ, 2006. — С. 77–81.

ГРИБНЫЕ АМИЛОЛИТИЧЕСКИЕ ЭНЗИМЫ И ИХ ДЕЙСТВИЕ НА НЕРАСТВОРИМЫЕ СУБСТРАТЫ

Н. В. Борзова
Е. В. Гудзенко
Л. Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии
НАН Украины, Киев

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

В результате проведенного скрининга выявлены активные штаммы с глюкоамилазной активностью среди представителей родов *Acremonium*, *Alternaria*, *Eupenicillium*, *Gliocladium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, однако самые активные биосинтетики принадлежали к родам *Aspergillus*, *Fusarium* и *Phoma*. Исследование некоторых условий культивирования 4 штаммов *Aspergillus* sp. показало, что оптимальными источниками углерода при глубинном культивировании этих штаммов были 2% -й картофельный или кукурузный крахмал, а также комбинация 2% -го картофельного крахмала с 1% -й мальтозой. Проведено сравнение действия препаратов глюкоамилазы и амилазы в процессах осахаривания нерастворимых крахмалсодержащих субстратов.

Ключевые слова: глюкоамилаза, амилаза, скрининг, источники углерода, гидролиз нерастворимых субстратов.

FUNGAL AMYLOLITIC ENZYMES AND THEIR EFFECT UPON INSOLUBLE SUBSTRATES

N. V. Borzova
E. V. Gudzenko
L. D. Varbanets

Zabolotny Institute of Microbiology
and Virology of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

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

Effective strains displaying glucoamylase activity have been obtained as a result of screening among the representatives of genera *Acremonium*, *Alternaria*, *Eupenicillium*, *Gliocladium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Rhizopus*. However, the most active biosynthetics belong to *Aspergillus*, *Fusarium* and *Phoma*. The studies of a number of cultivation conditions of four *Aspergillus* sp. strains indicated that the optimum sources of carbon at its submerged cultivation were 2% potato or corn starch, and also the mixture of 2% potato starch with 1% maltose. The comparative effects of glucoamylase and amylase preparations in saccharification of insoluble substrates containing starch have been studied.

Key words: glucoamylase, amylase, screening, carbon sources, hydrolysis of insoluble substrates.