

УДК 577.152.32

## ОЧИСТКА $\alpha$ -АМИЛАЗ *Aspergillus flavus* var. *oryzae* И *Bacillus subtilis* И ИХ СВОЙСТВА

Е. В. Авдюк  
Л. Д. Варбанец  
Л. А. Сафронова  
Е. С. Харкевич

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев

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

Получено 17.01.2012

Подобраны методы выделения и очистки энзимов с  $\alpha$ -амилазной активностью двух продуцентов — *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 и *Bacillus subtilis* 147, которые включали: фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрацию на TSK-геле Toyopearl HW-50 и ионообменную хроматографию на TSK-геле DEAE-Toyopearl 650 M (для  $\alpha$ -амилазы *A. flavus* var. *oryzae*); фракционирование сульфатом аммония и аффинную сорбцию на крахмале (для  $\alpha$ -амилазы *B. subtilis* 147).  $\alpha$ -Амилаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 была очищена в 37 раз, а  $\alpha$ -амилаза *B. subtilis* 147 — в 20 раз по сравнению с активностью энзима в супернатанте культуральной жидкости.  $\alpha$ -Амилаза *A. flavus* var. *oryzae* проявляла максимальную активность при pH 6,0 и температуре 60 °C, сохраняла 100% активности через 24 ч при pH 5,0–7,0 и в течение 3 ч при температуре 37 °C. pH-оптимум  $\alpha$ -амилазы *B. subtilis* составлял 8,0 с термооптимумом при 90 °C; энзим полностью сохранял исходную активность в течение суток при pH 7,0–9,0 и в течение 3 ч при температуре 37 °C, 60 °C и 70 °C. При температуре 80 °C  $\alpha$ -амилаза *B. subtilis* сохраняла 80% первоначальной активности после 3 ч инкубирования.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -амилаза, pH- и термооптимумы, pH- и термостабильность, очистка, *Aspergillus flavus* var. *oryzae*, *Bacillus subtilis*.

С каждым годом возрастают потребности промышленности в энзимных препаратах микроорганизмов и расширяются области их биотехнологического применения [1, 2]. Первое место по частоте использования занимают протеолитические энзимы, второе — амилолитические [3], наиболее распространенным из которых является  $\alpha$ -амилаза.

$\alpha$ -Амилазы [ЕС 3.2.1.1], катализирующие гидролиз  $\alpha$ -D-(1,4)-гликозидной связи в крахмале, гликогене и родственных поли- и олигосахаридах, синтезируются многими видами микроорганизмов, включая бактерии и грибы, а также обнаружены в тканях насекомых, млекопитающих и в высших растениях [6].  $\alpha$ -Амилаза является ключевым энзимом в процессе получения производных крахмала, используется в хлебопекарной, текстильной, спиртовой, бумажной промышленности, в пивоварении, производстве моющих средств [4]. В последние годы  $\alpha$ -амилазу начали широко применять в медицинской и клинической химии, что, в свою очередь, требует высокой степени чистоты энзима [5].

При получении  $\alpha$ -амилаз используют главным образом традиционные методы

очистки протеинов, такие как фракционирование сульфатом аммония, ионообменную хроматографию и гель-фильтрацию. Однако некоторые авторы склоняются к более простому, быстрому и легко воспроизводимому методу — аффинной сорбции на крахмале.

Целью настоящей работы было выделение препаратов с  $\alpha$ -амилазной активностью из супернатанта культуральной жидкости (СКЖ) *Aspergillus flavus* var. *oryzae* и *Bacillus subtilis*, их очистка и изучение оптимальных параметров действия (pH и температуры, при которых действуют энзимы, их термо- и pH-стабильности).

### Материалы и методы

Объектами исследования были два продуцента грибного и бактериального происхождения — *A. flavus* var. *oryzae* 80428 и *B. subtilis* 147, выделенные из рубца крупного рогатого скота и почвы, соответственно.

*A. flavus* var. *oryzae* культивировали на жидкой питательной среде 1 такого состава (г/л): NaNO<sub>3</sub> — 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 1; KCl — 0,5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 0,5; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 0,015; нерастворимый картофельный крахмал — 10; pH 6,0.

Для выращивания *B. subtilis* использовали жидкую питательную среду 2 такого состава (г/л):  $\text{NaNO}_3$  — 2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 1;  $\text{KCl}$  — 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; нерастворимый картофельный крахмал — 1; соевая мука — 10; pH 6,0.

Культивирование микроорганизмов на вышеуказанных средах проводили глубинным способом в 0,5 л колбах Эрленмэйера на качалках со скоростью вращения 220 об/мин при температуре 25 °С (*A. flavus* var. *oryzae*) и 42 °С (*B. subtilis*) в течение 5 и 3 сут, соответственно. После ферментации биомассу отделяли фильтрованием или центрифугированием, а в надосадочной жидкости определяли содержание протеина, амилолитическую и протеолитическую активность.

Для выделения энзимов *A. flavus* var. *oryzae* и *B. subtilis* к супернатанту культуральной жидкости добавляли сухую соль сульфата аммония до 90% насыщения под контролем pH. Смесь выдерживали в течение ночи при 4 °С. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 5 000 г и растворяли в 3-кратном объеме 3 М сульфата аммония.

Для очистки энзимов использовали методы гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Гель-фильтрацию проводили на колонке (2,0×32 см) с нейтральным TSK-гелем — Toyopearl HW-50 фирмы Toyo Soda (Япония), уравновешенным 0,01 М Tris-HCl-буфером, pH 6,5. Осадок, полученный в результате высаливания, диализировали в течение суток против дистиллированной воды, а затем 0,01 М Tris-HCl-буфера и концентрировали на полиэтиленгликоле (ПЭГ). Образец (1,7–2 мг) наносили на колонку, элюцию производили тем же буфером со скоростью 54 мл/ч. Фракции с амилолитической активностью объединяли и концентрировали ( $\approx$  в 5 раз) на ПЭГ. Далее полученный образец наносили на колонку (1,5×25 см) с DEAE-Toyopearl 650 М (Toyo Soda, Япония), уравновешенную 0,01 М Tris-HCl-буфером, pH 6,5. Элюцию проводили линейным градиентом NaCl (0–1,0 М) со скоростью 45 мл/ч. Активные фракции объединяли и использовали для дальнейших исследований.

Очистку энзимов осуществляли также с применением метода аффинной сорбции на крахмале. Сорбцию проводили в эппендорфах, используя в качестве субстрата нерастворимый картофельный крахмал (200 мг). Крахмал отмывали 0,01 М фосфатным буфером (ФБ) с pH 6,5 и центрифугировали при 5 000 г в течение 10 мин для удаления растворимых частиц. Затем эппендорфы с крах-

малом помещали на холод (20 мин) и далее смешивали крахмал с предварительно охлажденным диализатом (1 мл). Суспензию инкубировали на ледяной бане в течение 1 ч с медленным перемешиванием и через 2 ч центрифугировали (5 000 г, 5 мин, 4 °С). Осадки крахмала со связанной  $\alpha$ -амилазой 3 раза интенсивно промывали 0,01 М ФБ при 4 °С, каждый раз центрифугируя в том же режиме. Энзим десорбировали 0,01 М ФБ, нагретым до 60 °С, с последующим центрифугированием для осаждения гранул крахмала. Полученную надосадочную жидкость использовали для дальнейших исследований.

Амилолитическую активность определяли, как описано ранее [7].

Содержание протеина на всех этапах исследования регистрировали на спектрофотометре СФ-26 при 280 нм, а его количество — методом Lowry et al. [8].

Определение общей протеолитической активности осуществляли по методу Ансона в модификации Петровой [9].

При определении гликозидазной активности использовали соответствующие синтетические субстраты: *n*-нитрофенил- $\alpha$ - и - $\beta$ -D-галактопиранозид (Sigma, США), *n*-нитрофенил- $\alpha$ - и - $\beta$ -D-глюкопиранозид (Sigma, США), *n*-нитрофенил-N-acetyl- $\alpha$ - и - $\beta$ -D-галактопиранозид (Koch-Light, Великобритания), *n*-нитрофенил-N-ацетил- $\alpha$ -D-глюкозаминид (Koch-Light, Великобритания), *n*-нитрофенил- $\alpha$ - и  $\beta$ -D-ксилопиранозид (Sigma, США), *n*-нитрофенил- $\alpha$ -D-маннопиранозид (Sigma, США), *n*-нитрофенил- $\alpha$ -D-фукопиранозид (Sigma, США), *n*-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкуроида (Sigma, США), *n*-нитрофенил-N-acetyl- $\beta$ -D-глюкозаминид (Sigma, США). Для этого к 0,1 мл раствора энзима добавляли 0,2 мл 0,1 М фосфатно-цитратного буфера (ФЦБ), pH 5,2, и 0,1 мл 0,1%-го раствора субстрата в ФЦБ. Реакционную смесь инкубировали в течение 10 мин при температуре 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 1 М раствора бикарбоната натрия. В контрольную пробу вносили те же компоненты, но в обратном порядке. Количество *n*-нитрофенола, отщепившегося от субстрата в результате гидролиза, определяли колориметрическим методом по поглощению при 400 нм [10]. За единицу активности энзима принимали количество его, гидролизующее 1 мкмоль субстрата в 1 мин в условиях опыта.

Влияние температуры и pH на активность  $\alpha$ -амилаз исследовали в интервале температур от 4 до 100 °С, pH 3–12. В качестве буфера использовали 0,05 М универ-

сальный буферный раствор. Термостабильность препаратов определяли при температуре 37 °С и 60 °С (для  $\alpha$ -амилазы *A. flavus* var. *oryzae*) и при температуре 37 °С, 60 °С, 70 °С, 80 °С, 90 °С (для  $\alpha$ -амилазы *B. subtilis*), отбирая аликвоты через 15, 30, 60, 120, 180 мин инкубирования энзима при соответствующей температуре. рН-стабильность  $\alpha$ -амилаз изучали, выдерживая смесь препарата с соответствующим буфером в течение 24 ч и отбирая пробы для оценки активности через определенные промежутки времени (15, 30, 60, 120, 180 мин).

На рисунках (3–10) приведены средние арифметические величины; отклонение от среднего значения не превышало 5%.

### Результаты и обсуждение

Необходимая степень чистоты энзимных препаратов определяется областью их применения. Так, в легкой промышленности и сельском хозяйстве используют энзимы с незначительной степенью очистки (технические препараты), в то время как различные отрасли пищевой, микробиологическая и текстильная промышленность требуют применения более высокоочищенных препаратов. Особенно высокие требования к чистоте энзимных препаратов выдвигают медицинская и химическая промышленность [4, 5, 11].

В данной работе для очистки  $\alpha$ -амилаз были использованы как традиционные методы, в частности осаждение сульфатом аммония, гель-фильтрация, ионообменная хроматография, так и более высокоэффективный и избирательный метод — аффинная сорбция на крахмале.

Объектами исследования служила  $\alpha$ -амилаза, полученная из продуцентов грибного и бактериального происхождения — *A. flavus* var. *oryzae* и *B. subtilis*, соответственно.

Известно, что в культуральной жидкости большинства микромицетов можно выявить целый комплекс гликозидазной активности, что прежде всего связано со способом существования грибов, природными субстратами которых являются растительные остатки [12]. С использованием крахмала, казеина, а также ряда синтетических субстратов в СКЖ *A. flavus* var. *oryzae* была обнаружена:  $\alpha$ -амилазная,  $\alpha$ - и  $\beta$ -D-галактозидазная,  $\beta$ -D-глюкозидазная, N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазная, N-ацетил- $\beta$ -D-галактозидазная, а также протеолитическая активность.

Для очистки препарата  $\alpha$ -амилазы *A. flavus* var. *oryzae* от сопутствующих энзи-

мов супернатант культуральной жидкости фракционировали сульфатом аммония от 0 до 30% и от 30 до 90% насыщения. Применение сульфата аммония для выделения энзимных препаратов является традиционным, так как он хорошо растворим в воде и не оказывает вредного влияния на энзимы, а также способен стабилизировать протеиновые глобулы. Поскольку при 30% насыщении сульфатом аммония наблюдалось осаждение части амилалитической активности, в дальнейшем для выделения  $\alpha$ -амилазы *A. flavus* var. *oryzae* использовали осаждение супернатанта культуральной жидкости сульфатом аммония от 0 до 90% насыщения, что позволило повысить активность энзима в 3 раза. Однако не всегда высаливание сульфатом аммония приводит к повышению уровня активности энзима, иногда происходит только его концентрирование [13].

Дальнейшая схема очистки  $\alpha$ -амилазы *A. flavus* var. *oryzae* включала гель-фильтрацию на Toyopearl HW-50 геле (рис. 1). В результате гель-фильтрации диализата высаливания были получены три фракции, однако  $\alpha$ -амилазная активность присутствовала только во фракции I, причем была повышена в 1,5 раза, в то время как протеолитическая и другие виды гликозидазной активности были снижены в 30 и 2 раза, соответственно, по сравнению с активностью 90% высаливания.

Дальнейшая ионообменная хроматография фракции I на DEAE-Toyopearl 650 M геле с использованием градиента NaCl (0–1,0 М) (рис. 2) позволила очистить от сопутствующих протеинов и увеличить  $\alpha$ -амилазную активность препарата *A. flavus* var. *oryzae* в 9 раз по сравнению с результатами

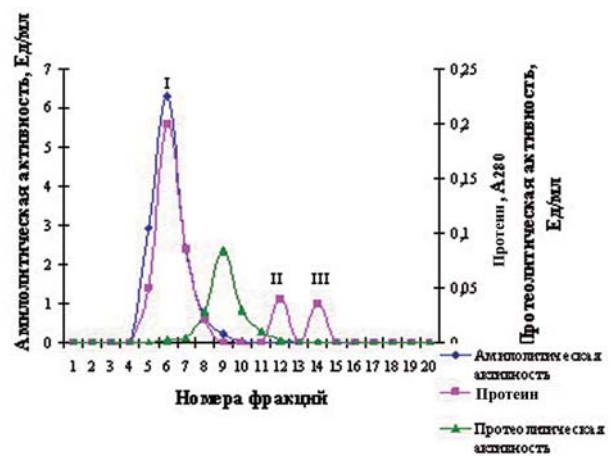


Рис. 1. Профиль элюции препарата  $\alpha$ -амилазы *A. flavus* var. *oryzae* на Toyopearl HW-50



гель-фильтрации и в 37 раз по сравнению с активностью в СКЖ. На данном этапе очистки удалось полностью избавиться от протеолитической,  $\beta$ -D- и  $\alpha$ -D-галактозидазной активности и снизить значения N-ацетил- $\beta$ -D-галактозидазной,  $\beta$ -D-глюкозидазной и N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазной активности до следовых количеств (рис. 3).

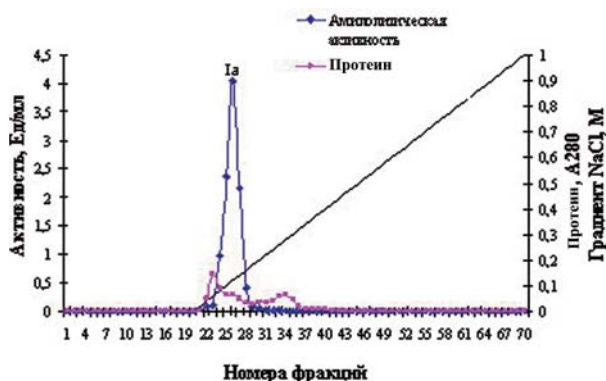


Рис. 2. Профиль элюции препарата  $\alpha$ -амилазы *A. flavus var. oryzae* на DEAE-Toyopearl 650 M

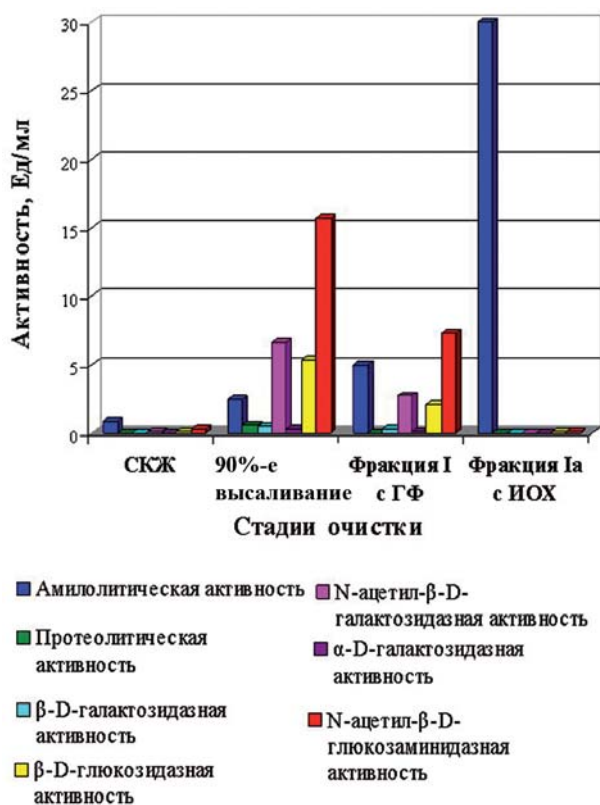


Рис. 3. Спектр активности препарата  $\alpha$ -амилазы *A. flavus var. oryzae* на разных стадиях очистки.

СКЖ — супернатант культуральной жидкости;  
ГФ — гель-фильтрация;  
ИОХ — ионообменная хроматография

Таким образом, предложенная схема очистки оказалась эффективной и позволила очистить энзимный препарат *A. flavus var. oryzae* в 37 раз по сравнению с активностью в СКЖ продуцента.

При производстве любого энзимного препарата важно получить максимально очищенный продукт при минимальных затратах, поэтому параллельно нами был использован более простой, доступный и дешевый метод очистки аффинной сорбции на крахмале. Однако использование этого метода для получения очищенного препарата  $\alpha$ -амилазы *A. flavus var. oryzae* не дало желаемых результатов. Удельная активность энзима не только не была увеличена в результате очистки, но и снизилась в 3 раза, что может быть связано с недостаточной сорбцией  $\alpha$ -амилазы *A. flavus var. oryzae* на данном субстрате. Поэтому в дальнейшем для получения очищенного препарата  $\alpha$ -амилазы *A. flavus var. oryzae* такой метод очистки не применялся.

В СКЖ другого продуцента  $\alpha$ -амилазы *B. subtilis* 147 помимо  $\alpha$ -амилазной активности (2,5–3,0 Ед/мл) отмечалась также протеолитическая активность (0,5–0,6 Ед/мл), в то время как другие виды гликозидазной активности не были обнаружены. Для выделения препарата  $\alpha$ -амилазы из супернатанта культуральной жидкости *B. subtilis* 147 прибегали к осаждению сульфатом аммония 90%-го насыщения, поскольку, как и в случае с  $\alpha$ -амилазой *A. flavus var. oryzae*, при 30%-м насыщении сульфатом аммония наблюдалось осаждение части амилолитической активности. Этот способ выделения энзима позволил повысить активность  $\alpha$ -амилазы *B. subtilis* 147 в 6 раз по сравнению с активностью в СКЖ.

Главная задача, стоящая перед нами, заключалась в отделении от  $\alpha$ -амилазы энзима с протеолитической активностью. С этой целью применили несколько методов, а именно: использование специфического для связывания протеаз субстрата (диасорб-бацитрацина), гель-фильтрацию и ионообменную хроматографию, аффинную сорбцию на крахмале.

Ранее исследователи [14] успешно применяли бацитрацин в качестве лиганда для связывания протеаз при аффинной хроматографии, поскольку он является их конкурентным ингибитором, взаимодействуя с зоной связывания субстрата в этих энзимах. Однако в наших исследованиях использование диасорб-бацитрацина не дало положительных результатов: субстрат сорбировал как

протеазу, так і амілазу, а десорбировать амілазу, змінюючи іонну силу буфера, не вдалося. Застосування для цієї цілі системи розчинників значительно ускладнювало би задачу і могло викликати інактивацию ензима.

Для очистки препарату *B. subtilis* 147 також були використані такі методи, як гель-фільтрація на TSK HW-50 гелі і іонообмінна хроматографія на DEAE-TSK 650 М гелі. Удельная активність  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* 147 після очистки цими методами не тільки не збільшувалася, але навіть знизилася, а розділення амілолітичного і протеолітичного ензимів не відбувалося.

Учитывая, що традиційні методи виявилися неефективними для очистки препарату  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* 147, в подальших дослідженнях використовували афінну сорбцію на крохмалі. Дослідники [15] більше 100 років тому назад виявили, що амілаза підшлункової залози здатна сорбуватися на картофельному нерозчинному крохмалі. Більше того, було показано, що не тільки крохмал, але і глікоген, а також декстрини можуть служити сорбентами  $\alpha$ -амілази. Причому сорбованість  $\alpha$ -амілази на полісахаридних субстратах підвищується з зниженням температури, тому сорбцію проводять при 0–4 °С, а десорбцію — при підвищених температурах. В якості субстратів для сорбування  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* 147 були використані два види нерозчинного картофельного крохмала, а також кукурузний крохмал. Найкращою здатністю до сорбування вирізнявся нерозчинний картофельний крохмал фірми «Авега» (Україна), тому саме цей вид крохмала використовували для подальшої роботи. Були підібрані оптимальні умови для сорбування  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* 147: 1) співвідношення кількості ензима і кількості крохмала — 300 мкг і 200 мг відповідно; 2) величина рН буфера — краще всього ензим сорбувався на крохмалі при слабкокислих і нейтральних значеннях рН. Ці результати збігаються з даними, отриманими дослідниками [13, 16] для  $\alpha$ -амілаз *Bacillus sp.* VKL20 і *B. subtilis* IFO3108, які також краще всього зв'язувалися з нерозчинним картофельним крохмалом при слабкокислих і нейтральних значеннях рН.

Важким умовою ефективного очищення  $\alpha$ -амілази є десорбція зв'язаного ензима з носителя. Відомо, що десорбція найбільш активно відбувається в умовах підвищених температур [17, 18]. Однак не завжди підвищення температури гарантує

ефективне відділення ензима від носителя. В якості елюантів використовували 2% -і розчини мальтози, глюкози, декстрина, 1 М ацетату кальцію і 1 М хлориду калію (рис. 4).  $\alpha$ -Амілаза *B. subtilis* 147 десорбувалася всіма досліджуваними елюантами, але найкращі результати були отримані з використанням 0,01 М фосфатного буфера при нагріванні до 60 °С і 2% -го розчину декстринов, коли спостерігалася 4- і 3-кратна очистка ензима (50 і 40 Ед/мг протеїна відповідно) порівняно з 90% -м висаливанням, при цьому вдалося майже повністю позбутися від протеази (0,02 Ед/мл).

Таким чином, афінна сорбція на крохмалі виявилася ефективним методом очищення  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* 147, що дозволило очистити її в 20 раз порівняно з СКЖ. По результатам, отриманим іншими авторами, з використанням афінного методу очищення на основі крохмала їм вдалося досягти 18-кратної очистки  $\alpha$ -амілази [6].

Дальніша робота була пов'язана з визначенням оптимальних значень рН і температури дії очищених  $\alpha$ -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* і *B. subtilis*, а також з вивченням їх стабільності при оптимальних значеннях рН і температури.

Для визначення рН-оптимумів дії очищених  $\alpha$ -амілаз (рис. 5) використовували 0,05 М універсальний буферний розчин з діапазоном значень рН від 3,0 до 12,0. Встановлено, що препарати  $\alpha$ -амілаз в залежності від штаму відрізнялися оптимальними умовами дії. Так,  $\alpha$ -амілаза *B. subtilis* 147 була активна в діапазоні рН від 4,0 до 9,0, з оптимальним значенням 8,0. Подібне властивість було характерно для  $\alpha$ -амілази *B. cohnii*, проявляючої активність в діапазоні рН від 4,0 до 10,0 [19],

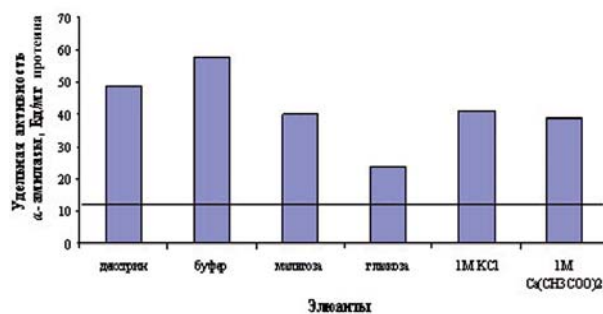


Рис. 4. Влияние разных веществ на десорбцию  $\alpha$ -амилазы *B. subtilis* 147 с нерозчинного картофельного крохмала. «—» — Амілолітична активність діалізату 90% -го висаливання

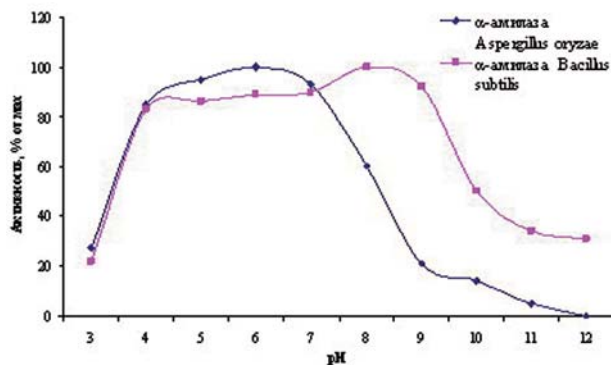


Рис. 5. Определение pH-оптимума очищенных  $\alpha$ -амилаз *A. flavus var. oryzae* и *B. subtilis* 147

$\alpha$ -амилазы *B. subtilis* JS-2004 с оптимумом pH 8,0 [20],  $\alpha$ -амилазы из *Bacillus* sp. VKL20, которая проявляла высокую амилитическую активность в широком диапазоне pH – от 6,0 до 11,0 [13], для  $\alpha$ -амилазы *B. subtilis* KIBGE HAS с pH-оптимумом 7,5 [21],  $\alpha$ -амилазы *B. cereus* с оптимумом pH 8,0 [22].

$\alpha$ -Амилаза *A. flavus var. oryzae* 80428 имела оптимум pH 6,0 и была активна при pH от 4,0 до 7,0.  $\alpha$ -Амилазы таких грибных продуцентов, как *A. niger*, *Penicillium citrinum* HBF62 и *P. camemberti* PL21, имели максимальную активность при pH 5,0 [24], 5,5 и 6,5 [6, 23], соответственно.

Таким образом, исследуемые нами препараты  $\alpha$ -амилаз были активными при кислых, нейтральных и щелочных значениях pH.

Изучение стабильности  $\alpha$ -амилаз с оптимальными значениями pH показало, что  $\alpha$ -амилаза *B. subtilis* 147 (рис. 6) полностью сохраняла стабильность в течение 24 ч при pH 7,0; 8,0; 9,0, а при pH 6,0 — 63% от

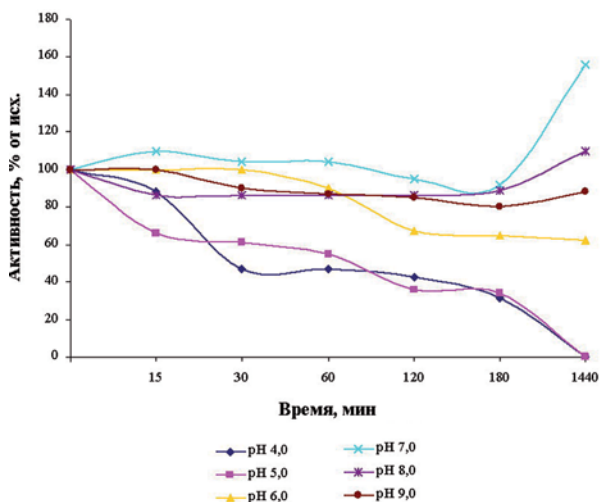


Рис. 6. pH-стабильность очищенной  $\alpha$ -амилазы *B. subtilis* 147

исходной активности. Значения pH 4,0 и 5,0 оказались неблагоприятными для  $\alpha$ -амилазы *B. subtilis* 147 — через 3 ч энзим сохранял всего 30% начальной активности, а через 24 ч активность полностью исчезала. Подобное свойство характерно для  $\alpha$ -амилазы *Bacillus* sp. VKL20, которая также была полностью стабильна в течение 24 ч при pH 7,0–9,0, а при pH 4,0 и 5,0 имела незначительную активность [13].  $\alpha$ -Амилаза *B. subtilis* JS-2004 через сутки при оптимальном значении pH 8,0 сохраняла 94% начальной активности, а при pH 7,0 и 9,0 — 90% [20].

$\alpha$ -Амилаза *A. flavus var. oryzae* (рис. 7) оказалась полностью стабильной в течение 24 ч при pH 5,0; 6,0; 7,0, а при pH 4,0 сохраняла только 17% исходной активности.  $\alpha$ -Амилаза *P. citrinum* HBF62 через сутки проявляла 95% начальной активности при pH 7,5, 80% — при pH 6,5 и 74% — при оптимальном значении pH 5,5 [6]. Таким образом, исследуемые нами  $\alpha$ -амилазы *B. subtilis* 147 и *A. flavus var. oryzae* были полностью стабильными при оптимальных значениях pH.

Зависимость активности большинства энзимов от температуры графически описывается кривой, с помощью которой определяют оптимальную для каждой реакции температуру. Определение термооптимума показало (рис. 8), что  $\alpha$ -амилаза *B. subtilis* 147 с pH-оптимумом 8,0 проявляла максимальную активность при температуре 90 °С, а  $\alpha$ -амилаза *A. flavus var. oryzae* с оптимумом pH 6,0 — при температуре 60 °С. Эти результаты согласуются с данными, полученными другими авторами для  $\alpha$ -амилазы *Bacillus* HUTBS62, которая проявляла максимальную активность при 90 °С [25],  $\alpha$ -амилазы *Geobacillus thermoleovorans* с термооптиму-

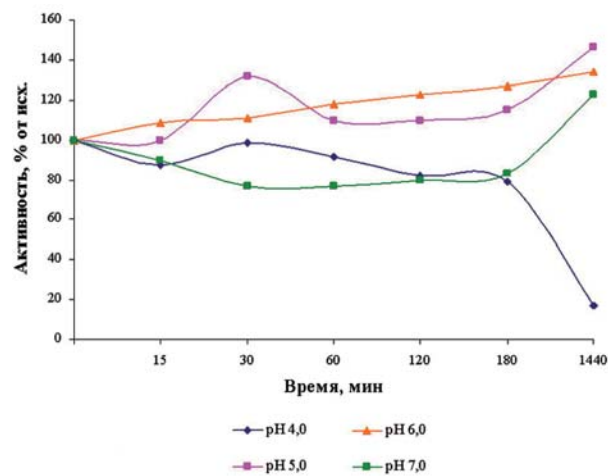


Рис. 7. pH-стабильность очищенной  $\alpha$ -амилазы *A. flavus var. oryzae*



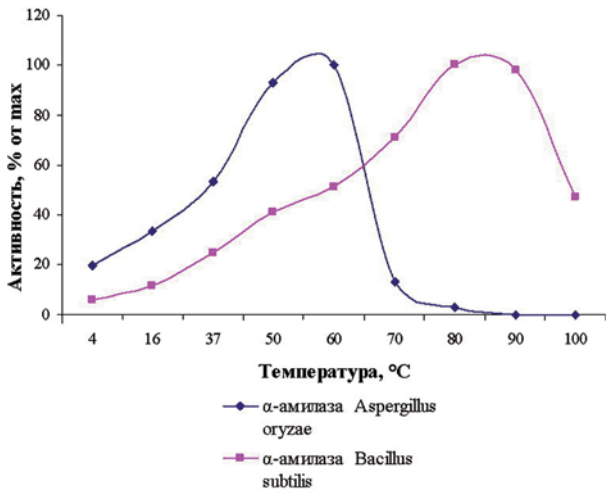


Рис. 8. Определение термооптимума очищенных α-амилаз *A. flavus var. oryzae* и *B. subtilis* 147

мом при 100 °C [1], α-амилазы *Bacillus* sp. PN5 с максимальной активностью при 90 °C [26], α-амилазы *P. citrinum* HBF62 с термооптимумом при 55 °C [6].

Определение термостабильности показало, что α-амилаза *B. subtilis* 147 с рН-оптимумом 8,0 (рис. 9) оказалась полностью термостабильной в течение 3 ч при температуре 37, 60 и 70 °C, при 80 °C — сохраняла 80% исходной активности. При оптимальной температуре 90 °C энзим сохранял 70% исходной активности в течение получаса и 7% — 3 ч инкубирования. α-Амилаза *Bacillus* HUTBS62 на протяжении 3-часового инкубирования при 60 °C сохраняла 80% исходной активности, при 70 °C — около 60%, при 80 °C — 55% и при 90 °C — 40% [25].

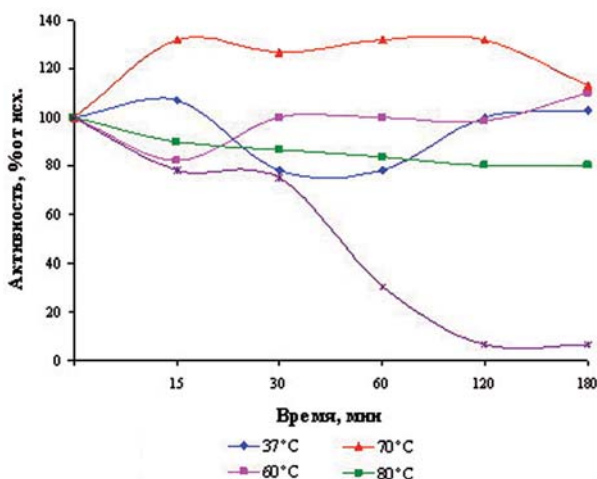


Рис. 9. Термостабильность очищенной α-амилазы *B. subtilis* 147

Изучение термостабильности α-амилазы *A. flavus var. oryzae* показало (рис. 10), что при инкубировании энзима в течение 3 ч при температуре 37 °C она сохраняет 100% активности, а при оптимальной температуре 60 °C уже через полчаса наблюдалось снижение активности до 22%, через 3 ч — до 3%. В то же время α-амилаза *P. citrinum* HBF62 при 3-часовой инкубации при 27 °C сохраняла 93% исходной активности, а при 60 °C — 75% [6].

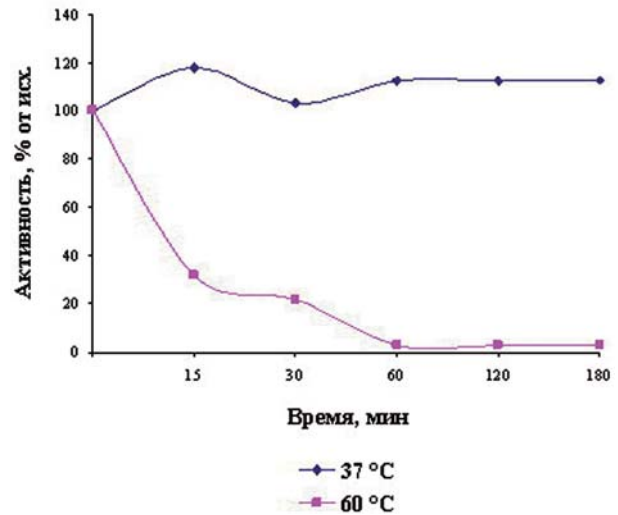


Рис. 10. Термостабильность очищенной α-амилазы *A. flavus var. oryzae*

Таким образом, в результате проведенных исследований были получены очищенные препараты α-амилаз *A. flavus var. oryzae* 80428 и *B. subtilis* 147. По результатам изучения рН- и термостабильности α-амилаза *B. subtilis* 147 является перспективной не только с научной точки зрения, но и для применения в различных отраслях промышленности, особенно для осахаривания крахмалосодержащего сырья, поскольку использование термостабильного энзима дает возможность непосредственно перейти от стадии желатинизирования крахмала к его расщеплению без дополнительных затрат на охлаждение реакторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Uma Maheswar Rao J. L., Satyanarayana T. Purification and characterization of a hyperthermostable and high maltogenic  $\alpha$ -amylase of an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2007. — V. 142, N 2. — P. 179–193.
2. Prakash O., Jaiswal N.  $\alpha$ -Amylase: An ideal representative of thermostable enzymes // Ibid. — 2009. — V. 160, N 8. — P. 2401–2414.
3. Mitidieri S., Souza M. A. H., Schrank A., Vainstein M. H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations // Biores. Technol. — 2006. — V. 97. — P. 1217–1224.
4. De Souza P. M., Magalhaes P. O. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry: A review // Braz. J. Microbiol. — 2010. — V. 41, N 4. — P. 850–861.
5. Rao D., Swamy A. V. N., SivaRamaKrishna G. Bioprocess technology strategies, production and purification of amylases: An overview // The Internet J. Genomics and Proteomics™ ISSN: 1540-2630. — 2007. — V. 2, N 2.
6. Metin K., Koc Ç., Burcu B. A. Z., Halil B. H. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase produced by *Penicillium citrinum* HBF62 // Afr. J. Biotechnol. — 2010. — V. 9, N 45. — P. 7692–7701.
7. ГОСТ 20264.4-89. Препараты ферментные. Методы определения амилазной активности. — Изд-во стандартов, 1989. — 17 с.
8. Lowry O. H., Rosebrough H. J., Faar A. L., Randal R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1963. — V. 193, N 1. — P. 265–275.
9. Петрова И. С., Винцюнайте М. Н. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения // Прикл. биохим. микробиол. — 1966. — Т. 2, № 1. — С. 322–327.
10. Буглова Т. Г., Маланчук В. М. и др. Физиолого-биохимические особенности некоторых продуцентов  $\alpha$ -галактозидазы // Микробиол. журн. — 1991. — Т. 53, № 6. — С. 34–41.
11. Shipra D., Surendra S., Vinni S., Manohar L. S. Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme // Intern. J. Pharm. Bio Sci. — 2011. — V. 2, Issue 1. — P. 486–496.
12. Улезло И. В., Запрометова О. М. -Галактозидаза микроорганизмов // Прикл. биохим. микробиол. — 1982. — Т. 18, № 1. — С. 3–15.
13. Kubrak O. I., Storey J. M., Storey K. B., Lushchak V. I. Production and properties of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. BKL20 // Can. J. Microbiol. — 2010. — V. 56. — P. 279–288.
14. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Янонис В. В. и др. Аффинная хроматография протеиназ на сорбентах, содержащих бацитрацин в качестве специфического лиганда // Биоорг. химия. — 1978. — Т. 4, № 9. — С. 1256–1263.
15. Галич И. П. Амилазы микроорганизмов. — К.: Наук. думка, 1987. — 192 с.
16. Mitsuiki S., Mukae K., Sakai M. et al. Comparative characterization of raw starch hydrolyzing  $\alpha$ -amylases from various *Bacillus* strains // Enzyme and microbial technology. — 2005. — V. 37. — P. 410–416.
17. Mendu D. R., Ratnam B. V. V., Purnima A., Ayyanna C. Affinity chromatography of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* // Ibid. — 2005. — V. 37, N 7. — P. 712–717.
18. Najafi M. F., Kembhavi A. One step purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from marine *Vibrio* sp. // Ibid. — 2005. — V. 36, N 4. — P. 535–539.
19. 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. — 2009. — V. 157. — P. 50–60.
20. Asgher M., Asad M. J., Rahman S. U., Legge R. L. A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing // J. Food Engin. — 2007. — V. 79. — P. 950–955.
21. Saeeda Bano, Shah Ali Ul Qader, Afsheen Aman et al. Purification and characterization of novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS // J. Amer. Assoc. Pharm. Sci. — 2011. — V. 12, N 1. — P. 255–261.
22. Annamalai N., Thavasi R., Vijayalakshmi S., Balasubramanian T. Extraction, purification and characterization of thermostable, alkaline tolerant  $\alpha$ -amylase from *Bacillus cereus* // Ind. J. Microbiol. — 2011. — V. 51, N 4. — P. 424–429.
23. Nouadri T., Meraihi Z.a, Shahrzed Dj-Dak., Bennamoun L. Purification and characterization of the  $\alpha$ -amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21 // Afric. J. Biotechnol. — 2010. — V. 4, N 6. — P. 155–162.
24. Kiran Kumar V., Ravi Sankar N., Shailaja R. et al. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase produced by *Aspergillus niger* using banana peels // J. Cell and Tissue Research. — 2011. — V. 11, N 2. — P. 2775–2780.
25. Al-Quadani F., Hazem A., Rasha N. Characteristics of a novel, highly acid- and thermostable amylase from thermophilic *Bacillus* strain HUTBS62 under different environmental conditions // Ann. Microbiol. — 2011. — V. 61, N 4. — P. 887–892.
26. Rajendra K. S., Kakoli D., Agarwal L., Nayyar P. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5 // Biores. Technol. — 2007. — V. 98. — P. 260–265.



**ОЧИЩЕННЯ  $\alpha$ -АМІЛАЗ  
*Aspergillus flavus* var. *oryzae*  
І *Bacillus subtilis* ТА ЇХНІ ВЛАСТИВОСТІ**

К. В. Авдіюк  
Л. Д. Варбанець  
Л. А. Сафронова  
Е. С. Харкевич

Інститут мікробіології і вірусології  
НАН України, Київ

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

Підібрано методи виділення та очищення ензимів з  $\alpha$ -амілазною активністю двох продуцентів — *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 і *Bacillus subtilis* 147, які включали: фракціонування сульфатом амонію, гель-фільтрацію на TSK-гелі Toyopearl HW-50 та іонообмінну хроматографію на TSK-гелі DEAE-Toyopearl 650 M (для  $\alpha$ -амілази *A. flavus* var. *oryzae*); фракціонування сульфатом амонію та афінну сорбцію на крохмалі (для  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* 147).  $\alpha$ -Амілазу *A. flavus* var. *oryzae* було очищено в 37 разів,  $\alpha$ -амілазу *B. subtilis* 147 — у 20 разів порівняно з активністю ензиму в культуральній рідині.  $\alpha$ -Амілаза *A. flavus* var. *oryzae* виявляла максимальну активність при pH 6,0 і за температури 60 °C, зберігала 100% активності через 24 год при pH 5,0–7,0 і протягом 3 год за температури 37 °C. pH-оптимум  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* 147 становив 8,0 з термооптимумом при 90 °C; ензим повністю зберігав вихідну активність упродовж доби при pH 7,0–9,0 та протягом 3 год за температури 37 °C, 60 °C, 70 °C. За температури 80 °C  $\alpha$ -амілаза *B. subtilis* 147 зберігала 80% початкової активності після 3 год інкубування.

**Ключові слова:**  $\alpha$ -амілаза, гель-фільтрація, іонообмінна хроматографія, *Aspergillus flavus* var. *oryzae*, *Bacillus subtilis*, очищення.

**PURIFICATION OF *Aspergillus flavus* var. *oryzae* AND *BACILLUS SUBTILIS*  $\alpha$ -AMYLASES AND THEIR PROPERTIES**

K. V. Avdiyuk  
L. D. Varbanets  
L. A. Safronova  
E. S. Harkevich

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

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

Methods of isolation and purification of enzymes with  $\alpha$ -amylase activity of the two producers — *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 and *Bacillus subtilis* 147 were selected which included: ammonium sulfate fractionation, gel filtration on TSK-gel Toyopearl HW-50 and ion-exchange chromatography on TSK-gel DEAE-Toyopearl 650 M (for  $\alpha$ -amylase, *A. flavus* var. *oryzae*); fractionation by ammonium sulfate and affinity sorption on starch (for  $\alpha$ -amylase, *B. subtilis* 147).  $\alpha$ -Amylase of *A. flavus* var. *oryzae* was purified in 37 times and  $\alpha$ -amylase *B. subtilis* 147 — in 20 times in comparison with enzyme activity in supernatant of cultural medium.  $\alpha$ -Amylase of *A. flavus* var. *oryzae* showed maximum activity at 60 °C and pH 6,0 and retained 100% activity after 24 h at pH 5,0–7,0 and after 3 h at 37 °C. The pH and temperature for optimum activity of the enzyme were 90 °C and 8,0. It was stable at pH 7,0–9,0 after 24 h and at 37 °C, 60 °C, 70 °C after 3 h and retained 80% of the initial activity after 3 h at 80 °C, respectively.

**Key words:**  $\alpha$ -amylase, gel-filtration, ion-exchange chromatography, *Aspergillus flavus* var. *oryzae*, *Bacillus subtilis*, purification.