

К.В. Авдіюк, Л.Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
буль. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна

ВПЛИВ ІОНІВ МЕТАЛІВ ТА СПЕЦИФІЧНИХ ХІМІЧНИХ РЕАГЕНТІВ НА АКТИВНІСТЬ α -АМІЛАЗ *ASPERGILLUS FLAVUS* VAR. *ORYZAE* І *BACILLUS SUBTILIS*

Вивчення впливу катіонів та аніонів на активність α -амілаз *Aspergillus flavus* var. *oryzae* і *Bacillus subtilis* показало, що досліджені ферменти чутливі до більшості катіонів, але стійкі до дії аніонів. Найбільш істотний інгібуючий вплив на активність α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* виявили іони Al^{3+} і Fe^{3+} , в той час як на активність α -амілази *B. subtilis* – іони Hg^{2+} , Cu^{2+} і Fe^{3+} . Пригнічення активності α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* та *B. subtilis* у присутності ЕГТА свідчить про наявність у їх структурі іонів металів. Важливу роль у ферментативному каталізі обох ензимів відіграють карбоксильні групи, про що свідчить їх інгібування 1-[3-(диметиламіно)пропіл]-3-етилкарбодіімід метіодидом. Про ймовірну участь сульфгідрильних груп у функціонуванні α -амілази *B. subtilis* свідчить її інгібування *n*-хлормеркурібензоатом, *N*-етилмалеїмідом і сульфітом натрію. На відміну від більшості глікозидаз, досліджені ензими не містять в активному центрі імідазольну групу гістидину.

Ключові слова: α -амілаза, *Aspergillus flavus* var. *oryzae*, *Bacillus subtilis*, іони металів, специфічні хімічні реагенти.

Одними з найпоширеніших ензимів за інтенсивністю використання у різних галузях промисловості є α -амілази (КФ 3.2.1.1; 1,4- α -D-глюкан глюканогідролази), які здійснюють неупорядкований гідроліз α -D- 1,4-глікозидних зв'язків у крохмалі, глікогені, споріднених полісахаридах, утворюючи в результаті реакції олігосахариди та декстрини різної молекулярної маси [12]. Вони застосовуються майже в усіх галузях, де переробляється крохмалевмісна сировина, на 75 % витіснивши хімічний гідроліз крохмалю, а саме: у харчовій промисловості, пивоварінні, хлібопеченні, крохмале-патоковому, паперовому, текстильному, спиртовому виробництвах, при обробці стічних вод та на одному з етапів отримання біопалива. Незамінні дані ферменти і у медицині та при виготовленні екологічно безпечних мийних засобів [8, 18].

Раніше у результаті скринінгу, проведеного серед 665 штамів мікроорганізмів – представників різних таксономічних груп, було відібрано два високоефективні продуценти α -амілаз *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 і *Bacillus subtilis* 147, оптимізовані умови та параметри їх культивування, відпрацьовані методи виділення і очистки ензимів, а також вивчені їх фізико-хімічні властивості [1]. Однак для створення ефективної технології одержання ферментних препаратів необхідно з'ясувати особливості їх дії. Одним із основних підходів для визначення механізму дії ферментів є дослідження функціональних груп їх активних центрів. Тому метою нашої роботи було вивчення впливу катіонів і аніонів, а також специфічних хімічних реагентів на активність α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* і *B. subtilis* для виявлення функціонально важливих груп, які відповідають за каталіз.

Матеріали і методи.

Об'єктами дослідження були позаклітинні α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147, вирощені на рідкому поживному середовищі Чапека з крохмалем наступного складу (г/л): $NaNO_3$ – 1 (*A. flavus* var. *oryzae*) чи 2 (*B. subtilis*); KH_2PO_4 – 1; KCl – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,015; нерозчинний картопляний крохмаль – 10 (*A. flavus* var. *oryzae*) чи 1 (*B. subtilis*); соєве борошно – 10 (*B. subtilis*); H_2O – до 1 л, рН 6,0 і 7,0, відповідно [1]. Культивування мікроорганізмів на вищевказаних середовищах проводили глибинним способом в 0,75 л колбах Ерленмейєра, які містили 100 мл поживного

середовища, на качалках з інтенсивністю перемішування 220 об/хв за температури 24 °С (*A. flavus* var. *oryzae*) і 42 °С (*B. subtilis*) протягом 5 і 3 діб, відповідно. Біомасу відділяли фільтруванням через чотири шари марлі (*A. flavus* var. *oryzae*) або центрифугуванням при 5000 г протягом 30 хв (*B. subtilis*). У фільтраті та супернатанті культуральної рідини визначали вміст білка і амілолітичну активність. Методи виділення і очистки α -амілаз описано раніше [1], вони включали: гель-фільтрацію на нейтральному TSK-гелі – Тоуорpearl HW-50 (“Тоуо Soda”, Японія) та іонообмінну хроматографію на гелі DEAE-Тоуорpearl 650 M (“Тоуо Soda”, Японія) при очистці α -амілази *A. flavus* var. *oryzae*, а також метод афінної сорбції на крохмалі –при очистці α -амілази *B. subtilis*.

Амілолітичну активність визначали йодометричним методом відповідно ГОСТу 20264.4-89 [2].

Наявність білка на всіх етапах дослідження реєстрували на спектрофотометрі СФ-26 при 280 нм, а його вміст – методом Lowry et al [2].

Питома активність очищених препаратів α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* і *B. subtilis* складала 229 од/мг білка та 43 од/мг білка, відповідно.

У дослідах щодо впливу катіонів, аніонів і специфічних хімічних реагентів на активність α -амілаз катіони використовували у вигляді сульфатів, лише Ag^+ – у вигляді нітрату, аніони – у вигляді солей калію або натрію в кінцевій концентрації 10^{-3} М і 10^{-2} М. Специфічні хімічні реагенти додавали до суміші для отримання кінцевих концентрацій 10^{-4} М, 10^{-3} М і 10^{-2} М – це: етилендіамінтетраацетат (ЕДТА), етиленглікольтетраацетат (ЕГТА), *o*-фенантролін, дитіотреїтол (ДТТ), β -меркаптоетанол (β -МБ), L-цистеїн, арсеніт натрію, N-етилmaleїмід (N-EM), *n*-хлормеркурібензоат (*n*-ХМБ), сульфід натрію, 1-[3-(диметиламіно)пропіл]-3-етилкарбодіімід метіодид (ДАПЕКМ), фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ). Інкубацію ферменту з реагентами проводили протягом 30 хв за температури 37 °С.

Аналіз одержаних результатів проводили шляхом їх статистичної обробки методами варіаційної і кореляційної статистики з використанням *t*-критерію Стьюдента [2]. У роботі вираховували середні значення величин і стандартні похибки ($M \pm m$). Значення при $P < 0,05$ розглядали як достовірні. Результати, що подані графічно, отримували за допомогою програми Microsoft Excel 2003.

Результати та їх обговорення. Більшість α -амілаз є металовмісними ферментами, активність яких може змінюватися у присутності іонів металів, які здатні виявляти активуючу чи інгібуючу дію. Зазвичай α -амілази містять у своїй структурі іони Ca^{2+} , які разом з іоном Na^+ утворюють тріаду металів, що відіграє важливу роль у стабілізації білкової молекули та її стійкості до термічної інактивації [21].

Порівняльне вивчення впливу іонів металів на активність досліджених α -амілаз показало (табл. 1), що ферментний препарат *A. flavus* var. *oryzae* виявився більш стійким до дії одновалентних катіонів (NH_4^+ , Na^+ , Li^+ , K^+ , Ag^+) у порівнянні з α -амілазою *B. subtilis*, активність якої знижувалася на 11-26 % у присутності 10^{-3} М NH_4^+ , Na^+ , Li^+ та K^+ . Двохвалентні катіони пригнічували активність обох α -амілаз, але ступінь інгібування був різним. Іони Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} у концентрації 10^{-3} М знижували активність α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* на 10-16 %, а іони Cu^{2+} , Hg^{2+} і Pb^{2+} – на 30-39 %. Найбільш істотний вплив на активність даної α -амілази мали іони Al^{3+} і Fe^{3+} , які майже повністю інгібували активність ферменту. При підвищенні концентрації катіонів до рівня 10^{-2} М їх негативний вплив на активність ферменту *A. flavus* var. *oryzae* зростав. У випадку α -амілази *B. subtilis* двохвалентні катіони виявляли сильніший інгібуючий вплив (табл. 1). Іони Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} та Fe^{2+} у концентрації 10^{-3} М пригнічували активність ферменту на 49-78 %, найбільше його активність знижувалася у присутності іонів Hg^{2+} – на 93%, або повністю втрачалася при додаванні іонів Cu^{2+} і Fe^{3+} . Поряд із цим, катіони Mn^{2+} і Mg^{2+} підвищували активність α -амілази *B. subtilis* на 33 % і 89 %, відповідно. Зі збільшенням концентрації катіонів на один порядок (10^{-2} М) підвищувався їх пригнічуючий ефект на активність ферменту, такі іони металів як Cu^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} повністю інгібували ензим, а у присутності Zn^{2+} активність знижувалася на 95,5 %. Лише іон Mg^{2+} активував даний ензим у обох досліджених концентраціях. З даних літератури відомо,

Таблиця 1

Вплив катіонів металів та амонію на активність α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* і *B. subtilis* ($M \pm m$, $n = 5$)

Катіон	Залишкова активність α -амілази <i>A. flavus</i> var. <i>oryzae</i> , %		Залишкова активність α -амілази <i>B. subtilis</i> , %	
	10^{-3} М	10^{-2} М	10^{-3} М	10^{-2} М
Контроль	100,0	100,0	100,0	100,0
NH ₄ ⁺	93,5 ± 3,7	85,0 ± 3,4	89,0 ± 3,7	39,0 ± 1,9
K ⁺	95,0 ± 4,7	94,0 ± 4,7	74,0 ± 3,7	69,0 ± 3,4
Na ⁺	100,0 ± 4,5	86,5 ± 3,8	84,0 ± 4,0	78,0 ± 3,8
Li ⁺	100,0 ± 4,5	100,0 ± 4,0	81,5 ± 4,0	48,0 ± 1,9
Ag ⁺	96,0 ± 4,8	53,0 ± 2,6	95,2 ± 4,6	27,5 ± 1,3
Ca ²⁺	90,0 ± 1,0	82,0 ± 1,6	93,5 ± 4,6	74,5 ± 3,6
Cu ²⁺	61,0 ± 3,0	21,0 ± 1,0	0	0
Co ²⁺	89,0 ± 4,4	86,0 ± 4,3	51,0 ± 2,0	0
Cd ²⁺	83,5 ± 3,7	23,0 ± 1,1	37,0 ± 1,5	0
Mg ²⁺	90,0 ± 4,5	89,0 ± 4,0	189,0 ± 8,5	116,0 ± 4,0
Mn ²⁺	91,5 ± 3,6	88,0 ± 3,5	133,5 ± 5,5	65,0 ± 1,5
Zn ²⁺	86,0 ± 4,3	72,0 ± 2,8	75,0 ± 4,3	14,5 ± 0,2
Pb ²⁺	70,0 ± 2,4	36,5 ± 1,4	94,0 ± 4,7	88,0 ± 3,6
Ba ²⁺	87,0 ± 3,4	73,0 ± 3,6	88,0 ± 4,4	60,0 ± 2,6
Hg ²⁺	60,5 ± 3,0	18,0 ± 0,9	7,0 ± 0,3	0
Ni ²⁺	90,0 ± 3,1	38,0 ± 1,5	30,0 ± 1,4	27,5 ± 1,2
Fe ²⁺	70,0 ± 3,5	0	22,0 ± 1,0	0
Fe ³⁺	0	0	0	0
Al ³⁺	9,0 ± 0,4	0	89,0 ± 4,4	0

Примітка. “0” – активність відсутня

що інгібування іонами Zn²⁺ активності α -амілаз є важливим параметром, що свідчить про їх термостабільність [5, 10].

Подібні результати активуючого впливу іонів Mn²⁺ і Mg²⁺ у концентрації 10^{-3} М були отримані також для α -амілази *Geobacillus thermoleovorans* NP54 [24], α -амілази *B. subtilis* KIBGE-HAS [7], α -амілази *B. subtilis* [9].

Одновалентні 10^{-3} М катіони Na⁺ і K⁺ пригнічували активність α -амілази *Rhizobium* sp. INPA R-926 [20]. Сильний інгібуючий вплив двохвалентних катіонів Co²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺ у концентрації 5 мМ спостерігався у випадку α -амілази *Trichoderma harzianum* [17], коли активність ферменту знижувалася на 74 % та 100 %, відповідно. Негативний вплив на активність α -амілази *Wangia* sp. C52 спричиняли 5 мМ іони Cu²⁺, Hg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Al³⁺, Fe³⁺, які на 52 %, 71 %, 18 %, 14 %, 28 % та 43 % знижували активність даного ензиму, відповідно [14]. Сильними інгібіторами α -амілази *Bacillus* sp. GRE1 були іони Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ у концентрації 1-10 мМ [11]. Інгібуючий вплив 1 мМ іонів Cu²⁺, Pb²⁺, Al³⁺ виявлявся і у випадку α -амілази *G. thermoleovorans* NP54, в той же час іони Ag⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Fe³⁺ активували її [24]. Деякі автори пояснюють інгібуючий вплив іонів металів конкуренцією, яка виникає між зовнішніми і білок-асоційованими катіонами, що у результаті призводить до зниження активності металоферменту [6, 17].

За даними літератури одні й ті ж катіони металів можуть викликати абсолютно протилежні ефекти на активність α -амілаз, виділених із різних джерел. Спільним є те, що активність більшості відомих α -амілаз практично повністю інгібуються іонами ртуті [9, 12, 24], що, у свою чергу, може свідчити про участь карбоксильних або сульфгідрильних груп у ферментативному каталізі [6, 16].

На відміну від більшості α -амілаз, які активуються і стабілізуються у присутності іонів Ca²⁺ [10, 14, 16, 17], активність досліджених нами ензимів не тільки не стимулювалася іонами Ca²⁺, але й знижувалася при зростанні концентрації останніх. Подібне явище ха-

Вплив аніонів на активність α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* і *B. subtilis*
($M \pm m$, $n = 5$)

Аніон	Залишкова активність α -амілази <i>A. flavus</i> var. <i>oryzae</i> , %		Залишкова активність α -амілази <i>B. subtilis</i> , %	
	10^{-3} М	10^{-2} М	10^{-3} М	10^{-2} М
Контроль	100,0	100,0	100,0	100,0
Cl ⁻	97,2 ± 4,3	100,0 ± 4,4	104,0 ± 5,0	132,5 ± 6,5
I ⁻	95,0 ± 4,7	92,0 ± 4,1	87,0 ± 2,7	135,0 ± 6,7
Br ⁻	114,0 ± 5,1	100,0 ± 5,0	107,5 ± 5,1	125,0 ± 5,8
F ⁻	113,0 ± 5,5	104,0 ± 4,7	81,0 ± 3,6	150,5 ± 6,7
NO ₃ ⁻	98,5 ± 4,4	93,5 ± 4,6	155,0 ± 7,5	210,0 ± 9,9
NO ₂ ⁻	99,5 ± 4,5	81,5 ± 3,6	88,0 ± 4,0	68,0 ± 3,1
N ₃ ⁻	95,5 ± 4,3	82,5 ± 1,6	93,5 ± 4,5	147,0 ± 7,3
H ₂ PO ₄ ⁻	98,0 ± 4,4	118,0 ± 5,8	107,5 ± 4,8	134,0 ± 5,9
S ₂ O ₃ ⁻²	88,0 ± 4,4	96,0 ± 4,3	118,0 ± 5,4	338,0 ± 14,3
SO ₄ ⁻²	100,0 ± 4,7	91,0 ± 8,5	92,5 ± 4,7	269,0 ± 13,1
AsO ₃ ⁻²	100,3 ± 4,5	102,5 ± 4,0	110,4 ± 4,5	273,0 ± 12,0
CO ₃ ⁻²	78,0 ± 3,6	96,5 ± 4,5	185,0 ± 8,6	494,0 ± 17,5
B ₄ O ₇ ⁻²	107,0 ± 4,3	95,5 ± 4,3	225,0 ± 9,3	451,0 ± 18,8
CH ₃ COO ⁻	96,0 ± 4,4	91,2 ± 4,4	105,0 ± 4,4	236,0 ± 9,4
C ₄ H ₅ O ₆ ⁻	102,0 ± 4,8	89,0 ± 4,4	113,0 ± 5,4	219,0 ± 8,6

рактерне для α -амілаз *Bacillus* sp. BKL20 [13], *Bacillus* sp. GRE1 [11], *B. thermooleovorans* NP54 [15] та ін.

При вивченні впливу аніонів на активність α -амілази *B. subtilis* показано (табл. 2), що більшість із них у концентрації 10^{-2} М активували даний ензим на 25-394 %, за виключенням NO₂⁻, який знижував активність ферменту на 32 %. У концентрації 10^{-3} М такі аніони як NO₃⁻, CO₃⁻² і B₄O₇⁻² підвищували активність ензиму на 55-125 %, Cl⁻, Br⁻, H₂PO₄⁻, S₂O₃⁻², AsO₃⁻², CH₃COO⁻ і C₄H₅O₆⁻ – на 4-18 %, в той час як I⁻, NO₂⁻, N₃⁻, F⁻, SO₄⁻² – інгібували фермент на 7-19 %. У концентрації 10^{-3} М більшість аніонів (NO₃⁻, NO₂⁻, H₂PO₄⁻, Cl⁻, CH₃COO⁻, N₃⁻, I⁻, C₄H₅O₆⁻) майже не впливали на активність α -амілази *A. flavus* var. *oryzae*, за виключенням аніонів S₂O₃⁻² і CO₃⁻², які інгібували активність ферменту на 12 % і 22 %, відповідно, та аніонів B₄O₇⁻², F⁻, Br⁻, які активували дію ензиму на 7-14 % (табл. 2). При концентрації аніонів 10^{-2} М активність ферменту знижувалася на 11 %, 17,5 % і 18,5 % у присутності C₄H₅O₆⁻, N₃⁻ і NO₂⁻, та зростала на 18 % при додаванні H₂PO₄⁻. Інші досліджені аніони або не впливали (Cl⁻, Br⁻, AsO₃⁻², F⁻), або дещо знижували (I⁻, NO₃⁻, S₂O₃⁻², SO₄⁻², CO₃⁻², CH₃COO⁻, B₄O₇⁻²) активність α -амілази *A. flavus* var. *oryzae*.

На жаль, вплив аніонів на активність α -амілаз досить важко пояснити. Однак, деякі дослідники вважають, що аніони здатні викликати зміну поверхневого заряду молекули ферменту, що може впливати на його активність.

Для дослідження функціональних груп активного центру α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* і *B. subtilis* були використані 6 типів специфічних реагентів: 1) хелатуючі, 2) на дисульфідні зв'язки, 3) на сульфгідрильні групи, 4) на карбоксильні групи, 5) на серин, 6) на імідазольну групу гістидину.

Хелатуючі реагенти. Більшість відомих на сьогодні α -амілаз є металозалежними ферментами, які містять у своїй структурі хоча б один іон Ca²⁺, саме з цим і пов'язана їх чутливість до дії хелатуючих агентів (ЕДТА, ЕГТА, *o*-фенантроліну), що здатні зв'язувати іони металів.

Вивчення впливу хелатуючих агентів на активність α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* і *B. subtilis* (рис. 1, 2) показало відсутність інгібуючої дії *o*-фенантроліну у всіх досліджених концентраціях.

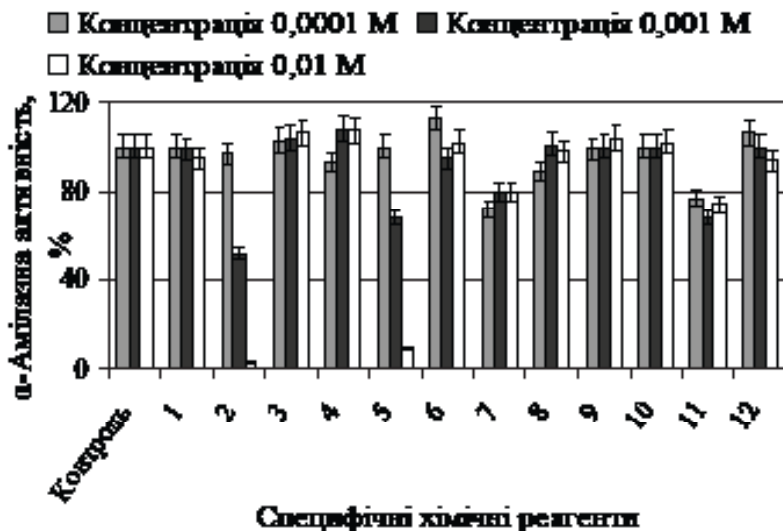


Рис. 1. Вплив специфічних хімічних реагентів на активність α -амілази *A. flavus var. oryzae*

Примітки: 1 – ЕДТА, 2 – ЕГТА, 3 – *o*-фенантролін, 4 – ДТТ, 5 – L-цистеїн, 6 – β -МЕ, 7 – *n*-ХМБ, 8 – *N*-ЕМ, 9 – сульфід натрію, 10 – арсеніт натрію, 11 – ДАПЕКМ, 12 – ФМСФ

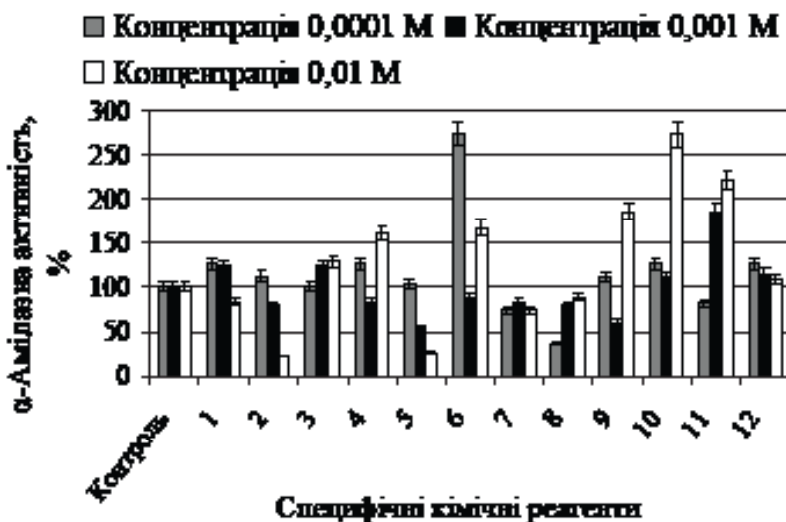


Рис. 2. Вплив специфічних хімічних реагентів на активність α -амілази *B. subtilis*

Примітки: 1 – ЕДТА, 2 – ЕГТА, 3 – *o*-фенантролін, 4 – ДТТ, 5 – L-цистеїн, 6 – β -МЕ, 7 – *n*-ХМБ, 8 – *N*-ЕМ, 9 – сульфід натрію, 10 – арсеніт натрію, 11 – ДАПЕКМ, 12 – ФМСФ

ЕДТА у концентрації 10^{-4} - 10^{-3} М не впливав на активність α -амілази *A. flavus var. oryzae* (рис. 1), але стимулював на 24,5-26 % активність α -амілази *B. subtilis* (рис. 2), при збільшенні його концентрації до рівня 10^{-2} М – активність даних ферментів знижувалася на 5 % і 16 %, відповідно.

Досліджені ферменти виявилися більш чутливими до впливу ЕГТА. Інгібуючий вплив даного реагенту спостерігався лише у концентрації 10^{-3} М і 10^{-2} М, коли α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* і *B. subtilis* втрачали 48 % і 20 % та 97 % і 77,5 % своєї активності, відповідно.

За даними літератури схожі результати були отримані у випадку α -амілази *Wangia* sp. C52, яка втрачала 36 % активності у присутності 5 мМ ЕГТА [14] та α -амілази *Vibrio* sp., активність якої знижувалася до 5 % у присутності 15 мМ ЕГТА [19].

Хоча α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* і *B. subtilis* і виявилися більш чутливими до дії ЕГТА, однак вони проявили стійкість у присутності 10 мМ ЕДТА, який пригнічує активність більшості α -амілаз навіть у більш низьких концентраціях [12, 17, 22]. Так, активність α -амілази *B. cohnii* US147 у присутності 5 мМ ЕДТА знижувалася на 22 % [10], а α -амілази *G. thermoleovorans* NP54 – на 60 %, хоча вона виявилася повністю стійкою до 1-5 мМ ЕГТА [24].

Оскільки активність α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* і *B. subtilis* пригнічується ЕГТА, це свідчить, що дані ферменти є металозалежними.

Реагенти на дисульфідні зв'язки – ДТТ, L-цистеїн та β -МЕ інгібували активність α -амілази *B. subtilis* від 11 % до 46 % у концентрації 10^{-3} М, а у концентрації 10^{-4} М і 10^{-2} М переважно активували ензим, за виключенням L-цистеїну, який у концентрації 10^{-2} М знижував активність на 74 % (рис. 2). Що стосується α -амілази *A. flavus* var. *oryzae*, її активність інгібувалася лише L-цистеїном на 32 % і 91 % при концентрації реагенту 10^{-3} М та 10^{-2} М, відповідно. ДТТ і β -МЕ практично не впливали на активність даного ферменту: лише незначне зниження активності на 5 % і 7 % спостерігали у присутності 10^{-3} М β -МЕ та 10^{-4} М ДТТ (рис. 1). Одержані результати можуть свідчити про наявність дисульфідних зв'язків у молекулі обох ферментів, що характерно також для α -амілази *B. aquimaris* VITP4 [4] та *G. thermoleovorans* NP54 [24].

Дослідження впливу реагентів на сульфгідрильні групи (тіолові інгібітори) – *n*-ХМБ, N-ЕМ, арсеніту натрію і сульфїту натрію на активність α -амілаз показало, що більшість із цих сполук не впливали на активність α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* (рис. 1), лише *n*-ХМБ незначно пригнічував активність ензиму (на 20 % у концентрації 10^{-3} і 10^{-2} М). У той же час усі досліджені тіолові сполуки, окрім арсеніту натрію, пригнічували активність α -амілази *B. subtilis*: при додаванні 10^{-4} - 10^{-2} М *n*-ХМБ ступінь інгібування становив 16–26 %, N-ЕМ у концентрації 10^{-4} , 10^{-3} і 10^{-2} М – 64 %, 20 % та 11 %, відповідно, сульфїт натрію лише у концентрації 10^{-3} М інгібував ензим на 40 % (рис. 2). Отже, інгі-

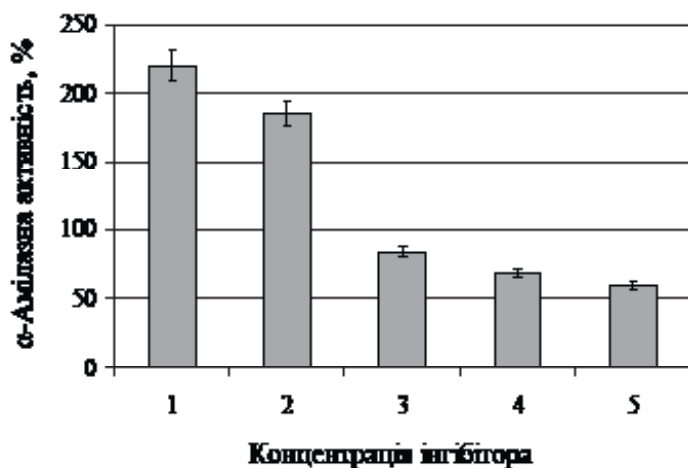


Рис. 3. Вплив ДАПЕКМ на активність α -амілази *B. subtilis*

Примітки: 1 – 10^{-2} М; 2 – 10^{-3} М; 3 – 10^{-4} М; 4 – 10^{-5} М; 5 – 10^{-6} М

буючий вплив тіолових інгібіторів свідчить про важливість сульфгідрильних груп у ферментативному каталізі α -амілази *B. subtilis*. Подібне явище характерне також для інших α -амілаз. Так, пригнічуючий вплив тіолових інгібіторів спостерігався у випадку α -амілази *T. thalophillus* KSV 17, активність якої інгібувалася на 90 % у присутності 5 мМ *n*-ХМБ [22], а α -амілаза *Vibrio* sp. при додаванні 5 мМ N-ЕМ втрачала лише 13 % активності [19]. α -Амілаза *Bacillus* sp. АЗ-15 у присутності 5 мМ сульфиту натрію виявляла лише 64 % своєї активності [5].

Специфічний реагент на карбоксильні групи ДАПЕКМ пригнічував активність α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* на 23 %, 32 % і 26 % у концентрації 10^{-4} , 10^{-3} і 10^{-2} М, відповідно (рис. 1). У випадку α -амілази *B. subtilis* даний інгібітор виявляв пригнічуючий ефект лише у концентрації 10^{-4} М (рис. 2). При зменшенні його концентрації до рівня 10^{-6} і 10^{-5} М ступінь інгібування зростав до 36 % (рис. 3). Інгібування у присутності ДАПЕКМ свідчить про важливість карбоксильних груп у акті каталізу даних ензимів. Подібні результати були отримані Metin K. зі співавторами [16] для α -амілази *P. citrinum* HBF62, активність якої пригнічувалася на 36 % і 80 %, відповідно, у присутності 10^{-3} М та 10^{-2} М 1-циклогексил-3-(2-морфолініл-4-етил)-карбодіімід метил *p*-толуен-сульфонату, який є специфічним інгібітором карбоксильних груп.

Реагент на наявність серину фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) не впливав на активність α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* і *B. subtilis* (рис. 1, 2). Отже, серин не бере участі у функціонуванні даних ензимів. Подібні дані були характерними для α -амілаз *Rhizobium* sp. INPA R-926 [20], *Vibrio* sp. [19], *Wangia* sp. C52 [14].

Відомо, що для більшості глікозидаз характерним є присутність в активному центрі імідазольної групи гістидину [3]. Специфічною реакцією на імідазольну групу є її фотоокиснення у присутності метиленового синього, який відіграє роль фотосенсибілізатора [3]. Встановлено, що ферментні препарати обох продуцентів не підлягали фотоінактивації (рис. 4, 5), лише незначне зниження активності спостерігалось у випадку α -амілази *B. subtilis* через 24 год інкубування (рис. 5). Отже, ймовірно, дані ензими не містять імідазольну групу гістидину у своїй структурі.

Отже, вивчення впливу іонів металів та специфічних хімічних реагентів показало, що α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* і *B. subtilis* є металозалежними ферментами, які містять

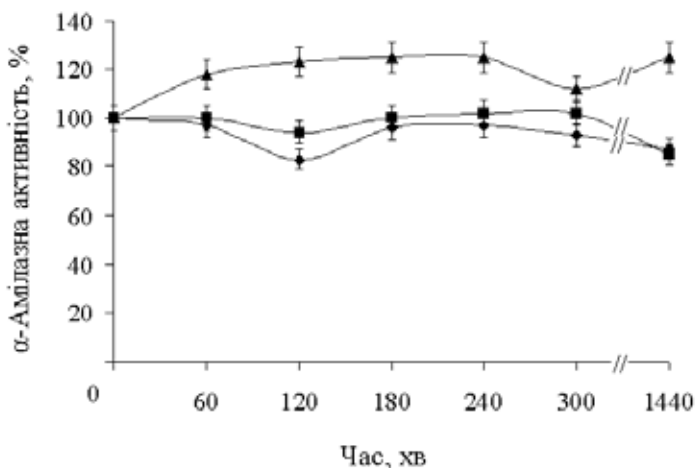


Рис. 4. Інактивація α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* фотоокисненням при pH 6,0

Примітки: —◆— контроль без метиленового синього на світлі, —■— з метиленовим синім на світлі, —▲— контроль з метиленовим синім у темряві

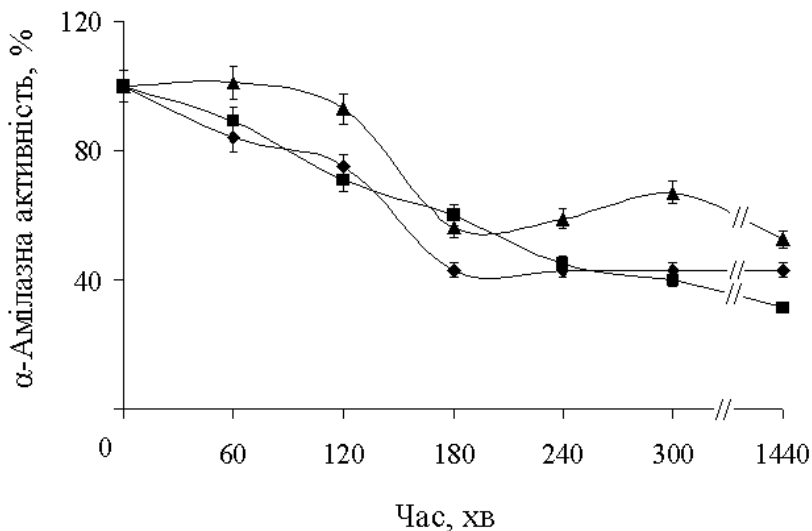


Рис. 5. Інактивація α -амілази *B. subtilis* фотоокисленням при рН 6,0

Примітки: ◆— контроль без метиленового синього на світлі, ■— з метиленовим синім на світлі, ▲— контроль з метиленовим синім у темряві

у своїй структурі дисульфідні зв'язки. Важливу роль у функціонуванні обох амілаз відіграють карбоксильні групи, а також сульфгідрильні групи у випадку α -амілази *B. subtilis*. На відміну від більшості досліджених глікозидаз дані амілази, ймовірно, не містять імідазольну групу гістидину.

Автори висловлюють подяку д-р біол. наук, проф. Н.М. Ждановій, докт. біол. наук, зав. відділу І.М. Курченко, канд. біол. наук, наук. співроб. О.С. Харкевич і канд. біол. наук, старш. наук. співроб. Л.А. Сафроновій за люб'язно надані для досліджень штами *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147.

Авдиюк Е.В., Варбанец Л.Д.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ И СПЕЦИФИЧЕСКИХ ХИМИЧЕСКИХ РЕАГЕНТОВ НА АКТИВНОСТЬ α -АМИЛАЗ *ASPERGILLUS FLAVUS* VAR. *ORYZAE* И *BACILLUS SUBTILIS*

Резюме

Изучение влияния катионов и анионов на активность α -амилазы *Aspergillus flavus* var. *oryzae* и *Bacillus subtilis* показало, что исследованные ферменты чувствительны к большинству катионов, но устойчивы к действию анионов. Наиболее существенное ингибирующее влияние на активность α -амилазы *A. flavus* var. *oryzae* оказали ионы Al^{3+} и Fe^{3+} , в то время как на активность α -амилазы *B. subtilis* — ионы Hg^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} . Подавление активности α -амилазы *A. flavus* var. *oryzae* и *B. subtilis* в присутствии ЭГТА свидетельствует о наличии в их структуре ионов металлов. Важную роль в ферментативном катализе обоих энзимов играют карбоксильные группы, о чём свидетельствует их ингибирование 1-[3-(диметиламино)пропил]-3-этилкарбодимид метиодидом. О возможном участии сульфгидрильных групп в функционировании α -амилазы *B. subtilis* свидетельствует её ингибирование *n*-хлормеркурибензоатом, *N*-этилмалеимидом и сульфитом натрия. В отличие от большинства гликозидаз, исследованные энзимы не содержат в активном центре имидазольную группу гистидина.

Ключевые слова: α -амилаза, *Aspergillus flavus* var. *oryzae*, *Bacillus subtilis*, ионы металлов, специфические химические реагенты.

Aydiuk K.V., Varbanets L.D.

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

**THE EFFECT OF METAL IONES AND SPECIFIC CHEMICAL REAGENTS
ON THE ACTIVITY OF *ASPERGILLUS FLAVUS* VAR. *ORYZAE* AND
BACILLUS SUBTILIS α -AMYLASES**

Summary

The effect of cations and anions on the activity of *Aspergillus flavus* var. *oryzae* and *Bacillus subtilis* α -amylases showed that the tested enzymes are sensitive to most of cations and resistant to anions. The most significant inhibitory effects on the activity of *A. flavus* var. *oryzae* α -amylase have been demonstrated by Al^{3+} and Fe^{3+} ions, while on the activity of *B. subtilis* α -amylase – Hg^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} ions. Inactivation of *A. flavus* var. *oryzae* and *B. subtilis* α -amylases in the presence of EGTA is indicated on the presence within their structure of metal ions. An important role in the enzymatic catalysis of both enzymes play carboxyl groups as evidenced by their inhibition of 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide. Inhibition of *B. subtilis* α -amylase by *p*-chloromercuribenzoate, *N*-ethylmaleimide and sodium sulfite is indicated on the probable involvement of the sulfhydryl groups in the functioning of the enzyme. Unlike most studied glycosidases the tested enzymes do not contain histidine imidazole group in the active center.

Key words: α -amylase, *Aspergillus flavus* var. *oryzae*, *Bacillus subtilis*, metal ions, specific chemical reagents.

1. 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. – 5, № 5. – С. 91-99.
2. Варбанець Л.Д., Борзова Н.В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. – К.: Наук. думка, 2010. – 440 с.
3. Рзаєва О.М., Борзова Н.В., Варбанець Л.Д. Дослідження функціональних груп активних центрів α -L-рамнозидаз *Penicillium commune* 266 // Укр. біохім. журн. – 2008. – 80, № 6. – С. 42-51.
4. Anurama A., Jayaraman G. Detergent stable, halotolerant α -amylase from *Bacillus aquimaris* VITP4 exhibits reversible unfolding // Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol. – 2011. – 2, N 2. – P. 366-376.
5. Arikan B. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15 // Bioresour. Technol. – 2008. – 99. – P. 4315-4320.
6. Asgher M., Javaid Asad M., Rahman S.U., Legge R.L. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing // J. Food Eng. – 2007. – 79, N 3 – P. 950-955.
7. Bano S., Qader S. A. U., Aman A., Azhar A. Partial purification and some properties of α -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS // Indian J. Biochem. Biophys. – 2009. – 46. – P. 401-404.
8. Das S., Singh S., Sharma V., Soni M.L. Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme // Int. J. Pharm. Bio Sci. – 2011. – 2, N 1. – P.486-496.
9. Demirkan E. Production, purification, and characterization of α -amylase by *Bacillus subtilis* and its mutant derivatives // Turk. J. Biol. – 2011. – 35. – P. 705-712.
10. Ghorbel R.E., Maktouf S., Massoud E.B., Bejar S., Chaabouni S.E. New thermostable amylase from *Bacillus cohnii* US147 with a broad pH applicability // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2008. – 157, N 1. – P. 50-60.
11. Haki G.D., Anceno A.J., Rakshit S.K. Atypical Ca^{2+} -independent, raw-starch hydrolyzing α -amylase from *Bacillus* sp. GRE1: characterization and gene isolation // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – 24, N 11. – P. 2517-2524.

12. Hmidet N., Maalej H., Haddar A., Nasri M. A novel α -amylase from *Bacillus mojavensis* A21: purification and biochemical characterization // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2010. – **162**, N 4. – P. 1018-1030.
13. 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. – **56**. – P. 279–288.
14. Liu J., Zhang Z., Dang H., Lu J., Cui Z. Isolation and characterization of a cold-active amylase from marine *Wangia* sp. C52 // Afr. J. Microbiol. Res. – 2011. – **5**, N 10. – P. 1156-1162.
15. Malhotra R., Noorwez S.M., Satyanarayana T. Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54 // Lett. Appl. Microbiol. – 2000. – **31**, N 5. – P. 378–384.
16. Metin K., Koç Ö., Ateşlier Z.B.B., Biyik H.H. Purification and characterization of α -amylase produced by *Penicillium citrinum* HBF62 // Afr. J. Biotechnol. – 2010. – **9**, N 45. – P. 7692-7701.
17. Mohamed S.A., Azhar E.I., Ba-Akdah M.M., Tashkandy N.R., Kumosani T.A. Production, purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma harzianum* grown on mandarin peel // Afr. J. Microbiol. Res. – 2011. – **5**, N 9. – P. 1018-1028.
18. Mojsov K. Microbial α -amylases and their industrial applications: a review // Int. J. Manag. IT Eng. – 2012. – **2**, N 10. – P. 583-609.
19. Najafi M.F., Kembhavi A. One step purification and characterization of an extracellular α -amylase from marine *Vibrio* sp. // Enzyme Microb. Technol. – 2005. – **36**, N 4. – P. 535–539.
20. Oliveira A.N., Oliveira L.A., Andrade J.S. Partial characterization of amylases of two indigenous central amazonian rhizobia strains // Braz. Arch. Biol. Technol. – 2012. – **53**, N 1. – P. 35-45.
21. Prakash O., Jaiswal N. α -Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2009. – **160**, N 8. – P. 2401-2414.
22. Rao K.S., Ellaiah P., Biradar K.V. Purification and characterization of thermostable amylase from a strain of *Thermoactinomyces thalophilus* KSV 17 // RGUHS J. Pharm. Sci. – 2012. – **2**, N 1. – P. 83-89.
23. Sajedi R.H., Naderi-Manesh H., Khajeh K.H., Ahmadvand R., Ranjbar B., Asoodeh A., Moradian F. A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104 // Enzyme Microb. Technol. – 2005. – **36**. – P. 666-671.
24. 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. – **142**, N 2. – P. 179-193.

Отримано 26.09.2014