

**К.В. Авдіюк, Л.Д. Варбанець**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143 Україна*

## **ВПЛИВ ІОНІВ МЕТАЛІВ ТА ХІМІЧНИХ РЕАГЕНТІВ НА АКТИВНІСТЬ $\alpha$ -АМІЛАЗИ *ACHROMOBACTER SP.* 7a**

*Вивчено вплив катіонів та аніонів на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter sp.* 7a. Показано, що досліджений фермент стійкий до дії більшості аніонів, однак чутливий до ряду катіонів. Найбільш істотний інгібувальний вплив на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter sp.* 7a виявили іони  $Hg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  і  $Ag^+$ . Зниження активності  $\alpha$ -амілази *Achromobacter sp.* 7a у присутності ЕДТА і ЕГТА свідчить про наявність у її структурі іонів металу. Суттєву роль у функціонуванні даного ферменту відіграють карбоксильні і сульфгідрильні групи, про що свідчить його інгібування 1-[3-(диметиламіно)пропіл]-3-етилкарбодіімід метіодидом і *n*-хлормеркурібензоатом відповідно.  $\alpha$ -Амілаза *Achromobacter sp.* 7a не містить в активному центрі імідазольну групу гістидину, на відміну від більшості відомих глікозидаз. Досліджений фермент виявив високу стійкість до Твіну-20, сечовини і пероксиду водню, що робить його конкурентноспроможним з раніше описаними  $\alpha$ -амілазами.*

*Ключові слова:*  $\alpha$ -амілаза, *Achromobacter sp.*, іони металів, хімічні реагенти, фотоокислення, детергенти.

Ензими родини  $\alpha$ -амілаз (КФ 3.2.1.1; 1,4- $\alpha$ -D-глюкан глюканогідролази) – одні з найпоширеніших ферментів у природі, які синтезуються майже всіма живими організмами: тваринами (панкреатична та слинна), рослинами, грибами, одноклітинними еукаріотами і мікроорганізмами. За класифікацією В. Henrissat, яка заснована на гомології амінокислотних послідовностей,  $\alpha$ -амілази належать до родини GH13 глікозилгідролаз [12]. Ці ферменти широко застосовуються у крохмалепереробній промисловості завдяки здатності розщеплювати внутрішні  $\alpha$ -D-1,4-глікозидні зв'язки у крохмалі та споріднених йому полімерах, утворюючи у результаті реакції продукти у  $\alpha$ -конфігурації, які є основою для багатьох промислових виробництв: виготовлення глюкозних і фруктозних сиропів, хлібопечення, пивоваріння. Крім того,  $\alpha$ -амілази використовуються для розшліхтовки текстилю, у паперовій і фармацевтичній промисловості, при виготовленні детергентів, біопалива та обробці стічних вод [12, 13].

Відомо, що багато речовин здатні змінювати активність ферменту, наприклад, за рахунок впливу на ступінь зв'язування з субстратом. Ці речовини називають ефекторами, серед яких виділяють активатори чи інгібітори. Найчастіше активаторами виступають іони двох- чи одновалентних металів, які можуть виконувати роль простетичних груп ферментів, або сприяють приєднанню субстрату до активного центру і утворенню фермент-субстратного комплексу [14]. Багато ферментів взагалі неактивні за відсутності іонів металів.

Раніше у результаті скринінгу, що був проведений серед штамів морських мікроорганізмів, виділених з Чорного моря, акваторії о. Зміїний,

було відібрано декілька штамів, один з яких мав перспективні характеристики та був ідентифікований як *Achromobacter* sp. Тому метою нашої роботи було вивчити вплив катіонів, аніонів, а також хімічних реагентів на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a для виявлення функціонально важливих груп, які відповідають за каталіз, а також визначення ступеня стабільності ферменту у присутності агресивних речовин.

**Матеріали і методи.** Об'єктом дослідження була позаклітинна  $\alpha$ -амілаза *Achromobacter* sp. 7a (з колекції морських культур Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова), яка виділена з Чорного моря поблизу острова Зміїний та ідентифікована у Київському національному університеті ім. Тараса Шевченка на кафедрі мікробіології та загальної імунології.

Культивування продуцента проводили на рідкому поживному середовищі Чапека з крохмалем наступного складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 2,0;  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  – 0,89;  $\text{KCl}$  – 0,05;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,05;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,0015; нерозчинний картопляний крохмаль – 18,0; розчин солоду – 2,2;  $\text{H}_2\text{O}$  – до 1,0 л; рН 6,0, в колбах Ерленмейера (0,75 л) зі 100 мл поживного середовища при інтенсивності перемішування 210 об/хв та за температури 28 °С протягом 3 діб. Біомасу відділяли центрифугуванням при 5000 g, 30 хв. У супернатанті культуральної рідини (СКР) визначали вміст білка і  $\alpha$ -амілазну активність.

Методи виділення і очистки  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a включали: осадження сульфатом амонію 90 % насичення і метод афінної сорбції на крохмалі, які описано у роботі [2]. Питома активність очищеного препарату  $\alpha$ -амілази складала 3,0 од/мг білка.

Активність  $\alpha$ -амілази визначали йодометричним методом відповідно ГОСТу 20264.4-89 [3], вміст білка – методом Lowry et al [3].

При вивченні впливу катіонів, аніонів і специфічних хімічних реагентів на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a, катіони використовували у вигляді сульфатів, лише  $\text{Ag}^+$  і  $\text{Pb}^{2+}$  – у вигляді нітрату і хлориду відповідно, аніони – у вигляді солей калію або натрію в кінцевій концентрації  $10^{-3}$  М і  $10^{-2}$  М. Специфічні хімічні реагенти: етилендіамінтетраацетат (ЕДТА), етиленглікольтетраацетат (ЕГТА), *o*-фенантролін, дитіотреїтол (ДТТ), L-цистеїн, арсеніт натрію, N-етилmaleїмід (N-EM), *n*-хлормеркурібензоат (*n*-ХМБ), сульфат натрію, 1-[3-(диметиламіно)пропіл]-3-етилкарбодіімід метіодид (ДАПЕКМ), феноїлметилсульфонілфторид (ФМСФ) додавали до суміші для отримання кінцевих концентрацій  $10^{-3}$  М і  $10^{-2}$  М. Інкубацію ферменту з реагентами проводили протягом 30 хв за температури 37 °С.

Визначення впливу детергентів, сечовини та перексиду водню проводили при інкубації препаратів  $\alpha$ -амілази протягом 30 хв за кімнатної температури в 1/15 М фосфатному буфері (рН 6,0) у присутності таких реагентів: 1) аніонних детергентів – додецилсульфату натрію (ДСNa) у концентрації 1, 5, 10, 50, 100 мМ та дезоксихолевої кислоти (ДХК) у концентрації 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0 %; 2) нейногенних детергентів – Тритону X-100 і Твіну-20 у концентрації 0,1, 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 % (об'єм/об'єм); 3) денатуранту – сечовини у концентрації 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 М; окисника – перексиду водню у концентрації 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1 М.

Фотоокислення здійснювали за рН 8,0 та температури 20 °С. Як дже-

рело світла використовували лампу розжарювання (200 Вт) з червоним світлофільтром на відстані 15 см від поверхні розчину. Як фотосенсибілізатор використовували  $5 \cdot 10^{-6}$  М розчин метиленового синього. Контролем слугували проби, що містили таку саму кількість фотосенсибілізатора, але знаходилися у темряві, а також зразки, що освітлювалися таким самим джерелом світла, але не містили барвника [3]. Дослід проводили у динаміці, відбираючи аліквоти через певні проміжки часу (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 і 1440 хв).

Аналіз одержаних результатів проводили шляхом їх статистичної обробки методами варіаційної і кореляційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента [3]. 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.** Загальною характеристикою більшості  $\alpha$ -амілаз є наявність у структурі молекули іонів кальцію, які відіграють важливу роль для активації, стабілізації та підтримання просторової структури ферменту. Крім того, активність  $\alpha$ -амілаз, виділених з різних джерел, пригнічується хелатуючими агентами, а також іонами важких металів, такими як  $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  та ін., що свідчить про участь залишків цистеїну у ферментативному каталізі [14].

Вивчення впливу іонів металів на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a показало (табл. 1), що вона виявилася більш стійкою до дії одновалентних катіонів ( $NH_4^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $K^+$ ), ніж двохвалентних, за виключенням іону  $Ag^+$ , який інгібував фермент на 85,0 і 100,0 % у концентрації  $10^{-3}$  і  $10^{-2}$  М. У випадку  $\alpha$ -амілази *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428, лише іон

**Таблиця 1**  
**Вплив катіонів, аніонів та амонію на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a ( $M \pm m$ , n = 5)**

Катіон	$\alpha$ -Амілазна активність, %		Аніон	$\alpha$ -Амілазна активність, %	
	$10^{-3}$ М	$10^{-2}$ М		$10^{-3}$ М	$10^{-2}$ М
Контроль	100,0	100,0	Контроль	100,0	100,0
$NH_4^+$	95,0 $\pm$ 4,5	102,0 $\pm$ 4,8	$Cl^-$	100,0 $\pm$ 4,8	90,0 $\pm$ 4,4
$K^+$	93,0 $\pm$ 4,6	91,0 $\pm$ 4,4	$I^-$	96,5 $\pm$ 4,5	93,0 $\pm$ 4,1
$Na^+$	95,5 $\pm$ 4,5	100,0 $\pm$ 4,8	$Br^-$	84,0 $\pm$ 4,0	110,0 $\pm$ 5,0
$Li^+$	95,0 $\pm$ 4,6	99,2 $\pm$ 4,8	$F^-$	94,5 $\pm$ 4,3	87,2 $\pm$ 4,1
$Ag^+$	15,0 $\pm$ 0,7	0	$NO_3^-$	95,0 $\pm$ 4,6	85,0 $\pm$ 4,2
$Ca^{2+}$	96,0 $\pm$ 4,7	70,0 $\pm$ 3,4	$NO_2^-$	90,0 $\pm$ 4,4	19,0 $\pm$ 0,8
$Cu^{2+}$	19,0 $\pm$ 0,8	0	$N_3^-$	94,0 $\pm$ 4,3	100,0 $\pm$ 4,9
$Co^{2+}$	72,0 $\pm$ 3,5	63,0 $\pm$ 3,0	$H_2PO_4^-$	82,0 $\pm$ 4,0	101,0 $\pm$ 5,0
$Cd^{2+}$	24,5 $\pm$ 1,1	6,0 $\pm$ 0,2	$S_2O_3^{2-}$	100,0 $\pm$ 4,8	120,0 $\pm$ 5,6
$Mg^{2+}$	93,0 $\pm$ 4,0	100,0 $\pm$ 4,9	$SO_4^{2-}$	102,0 $\pm$ 4,8	86,5 $\pm$ 4,1
$Mn^{2+}$	79,5 $\pm$ 3,8	54,5 $\pm$ 2,5	$AsO_3^{2-}$	107,0 $\pm$ 5,0	94,5 $\pm$ 4,0
$Zn^{2+}$	33,5 $\pm$ 1,5	13,6 $\pm$ 0,6	$CO_3^{2-}$	104,0 $\pm$ 5,0	95,0 $\pm$ 4,5
$Pb^{2+}$	99,0 $\pm$ 4,7	3,5 $\pm$ 0,15	$B_4O_7^{2-}$	100,0 $\pm$ 5,0	38,5 $\pm$ 1,8
$Hg^{2+}$	0	0	$CH_3COO^-$	84,0 $\pm$ 4,1	73,0 $\pm$ 3,4
$Fe^{2+}$	67,0 $\pm$ 3,0	0	$C_4H_5O_6^-$	100,0 $\pm$ 4,9	99,0 $\pm$ 4,8
$Fe^{3+}$	0	0			
$Al^{3+}$	0	0			

Ag<sup>+</sup> знижував її активність [1], але в меншому ступені у порівнянні з досліджуваним нами ензимом.

Двохвалентні катіони у концентрації 10<sup>-3</sup> М в різному ступені пригнічували активність α-амілази *Achromobacter* sp. 7a: іони Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> майже не впливали, іони Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> і Fe<sup>2+</sup> знижували активність α-амілази на 20,5–33,0 %, а іони Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> – на 66,5–81,0 %. При підвищенні концентрації катіонів до рівня 10<sup>-2</sup> М їх негативний вплив зростав: іони Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> і Mn<sup>2+</sup> пригнічували активність ферменту на 30,0–45,5 %, а іони Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> і Fe<sup>2+</sup> – на 86,4–100,0 % (табл. 1). Лише іон Mg<sup>2+</sup> у концентрації 10<sup>-2</sup> М не впливав на даний ензим, як і у α-амілази *Bacillus* sp. RM16 [8]. Найбільш істотний вплив на активність α-амілази *Achromobacter* sp. 7a мали іони Hg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> і Fe<sup>3+</sup>, які повністю інгібували фермент у обох концентраціях, що є характерним також для описаної нами раніше [1] α-амілази *Bacillus subtilis* 147.

Подібні результати інгібувального впливу іонів Co<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> і Fe<sup>2+</sup> (концентрація 5 мМ) були отримані також для α-амілази *Bacillus cereus* GA6 [16], іонів Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> – для α-амілази *Bacillus* sp. RM16 [8], іонів Hg<sup>2+</sup> і Zn<sup>2+</sup> – для α-амілази *Geobacillus thermoleovorans* [15], іонів Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> і Ag<sup>+</sup> – для α-амілази *Alicyclobacillus acidocaldarius* [17]. У присутності 10 мМ іонів Cu<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup> і Hg<sup>2+</sup>, активність α-амілази *Pseudomonas* sp. SPH4 знижувалася до рівня 53, 28 і 25 % відповідно [7].

Відомо, що іони Ca<sup>2+</sup> здатні по-різному впливати на α-амілази. Більшість α-амілаз є кальцій-залежними ферментами, активність і стабільність яких підвищується у присутності іонів Ca<sup>2+</sup> [7, 15, 16]. Хоча зустрічаються і кальцій-незалежні ферменти, до яких належить досліджена нами α-амілаза *Achromobacter* sp. 7a, α-амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147 [1], α-амілаза *Bacillus* sp. RM16 [8], α-амілаза *Bacillus macquariensis* [5].

Інгібувальний вплив іонів металів щодо α-амілаз може бути пов'язаний з конкурентною боротьбою за сайти зв'язування кальцію, які присутні у молекулі ферменту. Так, відомо, що у молекулі α-амілази *B. licheniformis* існує три центри зв'язування кальцію: основний (Ca I), який локалізований на поверхні між доменами A і B, та додаткові (Ca II і Ca III). Ca II центр розташований біля першого (Ca I), і у присутності іону Na<sup>+</sup> вони формують Ca-Na-Ca тріаду, яка відіграє важливу роль у підтриманні структури білка в правильній конформації та у протидії температурній інактивації ензиму. Ca III центр зв'язування локалізується на поверхні між доменами A і C, функціонує як місток між ними [11]. Згідно досліджень [14], зовнішній іон металу, що присутній у високій концентрації, може конкурувати з білок-асоційованим іоном металу, який знаходиться у нижчій концентрації, та замінити його у місці зв'язування металу, навіть якщо спорідненість першого до сайту зв'язування нижча.

За даними літератури [8], одні й ті ж самі катіони здатні по-різному впливати на активність α-амілаз. Досліджений нами фермент, як більшість відомих α-амілаз, інгібувався іонами важких металів, такими як Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> та ін., що може свідчити про важливість сульфгідрильних груп у ферментативному каталізі.

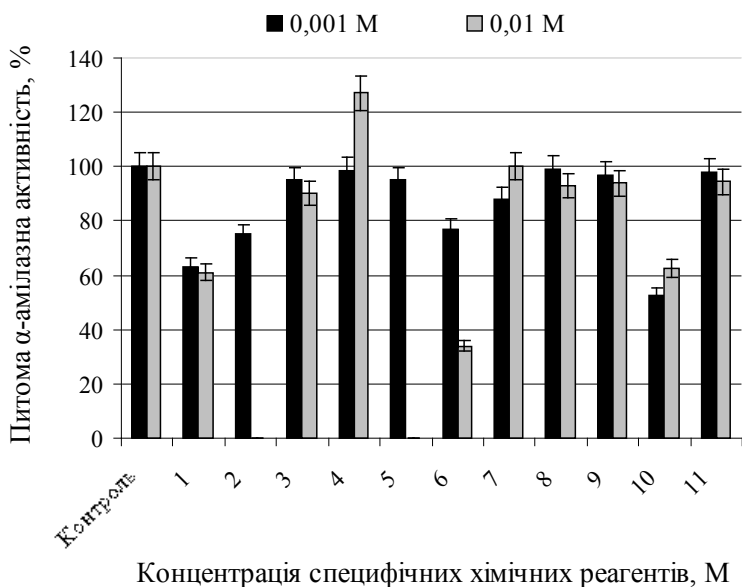
При вивченні впливу аніонів на активність α-амілази *Achromobacter* sp. 7a показано (табл. 1), що більшість з них у концентрації 10<sup>-3</sup> М не впли-

вали на даний ензим, за виключенням  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{N}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , які знижували активність ферменту на 5,0–18,0 %. У концентрації  $10^{-2}$  М такі аніони як  $\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_6^-$ ,  $\text{N}_3^-$  і  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  виявляли нейтральну дію, іони  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{AsO}_3^{2-}$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  і  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  знижували активність ензиму на 5,0–27,0 %, тоді як іони  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$  і  $\text{NO}_2^-$  – на 61,5–81,0 %. Лише при використанні аніонів  $\text{Br}^-$  і  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a дещо підвищувалася – як і у випадку  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* 147, активність якої зростала у присутності майже всіх досліджених вище аніонів у заданій концентрації, за виключенням  $\text{NO}_2^-$  [1]. Пояснити вплив аніонів на активність  $\alpha$ -амілаз досить важко, оскільки відсутні будь-які літературні відомості щодо механізму їх дії. Відомо лише, що аніони здатні змінювати поверхневий заряд молекули ензиму, впливаючи, таким чином, на активність.

Одним із методів вивчення функціональних груп активного центру ферментів, які відіграють важливу роль у ферментативному каталізі, є використання специфічних хімічних реагентів. З цією метою було використано хелатуючі речовини, а також реагенти, специфічні на дисульфідні зв'язки, сульфгідрильні групи, карбоксильні групи, на серин та імідазольну групу гістидину.

*Хелатуючі реагенти* (ЕДТА, ЕГТА, *o*-фенантролін), завдяки здатності зв'язувати іони металів, викликають зниження активності металозалежних ферментів, до яких належать і  $\alpha$ -амілази.

Вивчення впливу хелатуючих агентів на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a показало (рис. 1), що у концентрації  $10^{-3}$  і  $10^{-2}$  М ЕДТА і ЕГТА пригнічували активність ферменту на 37 та 39 % і 25 та 100 % відповідно, у той час як вплив *o*-фенантроліну був незначним (5 і 10 % відповідно). Подібні результати були отримані у випадку  $\alpha$ -амілаз



**Рис. 1.** Вплив специфічних хімічних реагентів на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a

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

*A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147, які у присутності  $10^{-3}$  і  $10^{-2}$  М ЕГТА втрачали 48 та 20 % і 97 та 77,5 % своєї активності відповідно [1]. При додаванні  $10^{-3}$  і  $10^{-2}$  М ЕДТА, активність  $\alpha$ -амілази *B. cereus* GA6 знижувалася до рівня 70 і 45 % [16],  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* KIBGE HAS – до рівня 96 і 44 % [6],  $\alpha$ -амілази *G. thermoleovorans* – до рівня 94 і 75 % [15].

Оскільки за даними деяких дослідників [4] ЕГТА є специфічним реагентом на іони  $\text{Ca}^{2+}$ , можна припустити, що досліджений фермент містить у своїй структурі іони  $\text{Ca}^{2+}$ .

*Реагенти на дисульфідні зв'язки* – ДТТ і L-цистеїн по-різному впливали на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a. ДТТ стимулював активність даного ферменту у концентрації  $10^{-2}$  М, як і у випадку  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* KIBGE HAS [6], тоді як L-цистеїн у концентрації  $10^{-3}$  і  $10^{-2}$  М інгібував його на 5 і 100 % відповідно (рис. 1). Отримані результати можуть свідчити про наявність дисульфідних зв'язків у структурі  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a, що характерно також для  $\alpha$ -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147 [1].

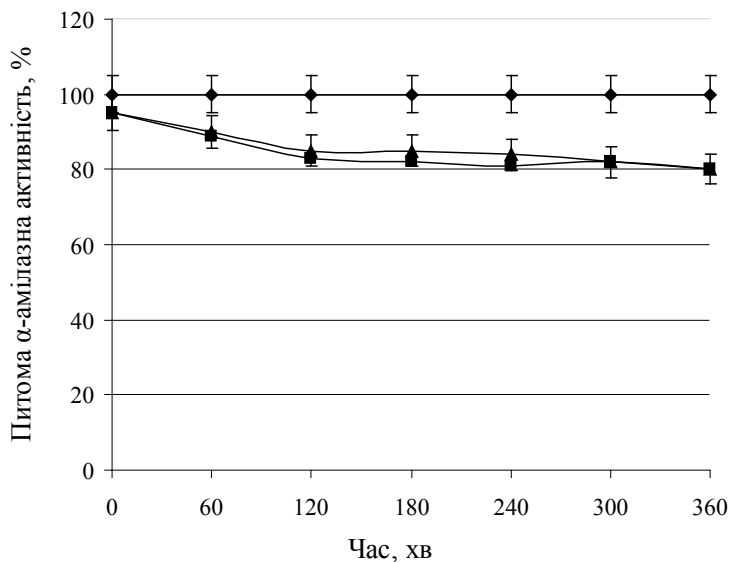
*Реагенти на сульфгідрильні групи (тіолові інгібітори)* – N-ЕМ, арсеніт натрію і сульфід натрію майже не впливали на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a, лише  $10^{-3}$ М N-ЕМ знижував активність ферменту на 12 % (рис. 1). Ще один тіоловий інгібітор *n*-ХМБ виявляв сильнішу інгібувальну дію: у концентрації  $10^{-3}$  і  $10^{-2}$  М ступінь інгібування становив 23 і 66 % відповідно, що свідчить про важливість сульфгідрильних груп у ферментативному каталізі  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a. Схожі результати були отримані у випадку  $\alpha$ -амілази *B. cereus* МТСС 10205, яка повністю втрачала свою активність у присутності *n*-гідромеркурійбензойної кислоти [10] та  $\alpha$ -амілази *Bacillus* sp. RM16, активність якої знижувалася на 28 % при додаванні 5 мМ N-ЕМ [8].

*Специфічний реагент на карбоксильні групи* ДАПЕКМ пригнічував активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a на 47,5 і 37,5 % у концентрації  $10^{-3}$  і  $10^{-2}$  М відповідно (рис. 1), що вказує на важливість карбоксильних груп у акті каталізу даного ферменту. Подібне явище характерне також для  $\alpha$ -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 [1].

*Реагент на наявність селену* – фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) – практично не впливав на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a (рис. 1), що спостерігали також у випадку  $\alpha$ -амілази *B. cereus* МТСС 10205 [10] і  $\alpha$ -амілази *Pseudomonas* sp. SPH4 [7]. Отримані дані вказують на відсутність селену в активному центрі ферментів.

*Ідентифікація імідазольної групи фотоокисленням.* Специфічною реакцією на імідазольну групу гістидину є її фотоокиснення у присутності метиленового синього, який відіграє роль фотосенсибілізатора. Фотоокислення призводить до розриву гетероциклу імідазолу і до інактивації ферменту. Показано, що  $\alpha$ -амілаза *Achromobacter* sp. 7a не підлягала фотоінактивації (рис. 2), що свідчить про ймовірну відсутність імідазольної групи гістидину в її структурі, як і у випадку  $\alpha$ -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147 [1].

Оскільки  $\alpha$ -амілази мають широке практичне застосування, зокрема у виробництві мийних засобів, шампунів та косметики, нами було досліджено вплив поверхнево-активних речовин (ДСНа, Тритону X-100, Твіну-20, дезоксихолевої кислоти), денатуранту (сечовини) та окисника

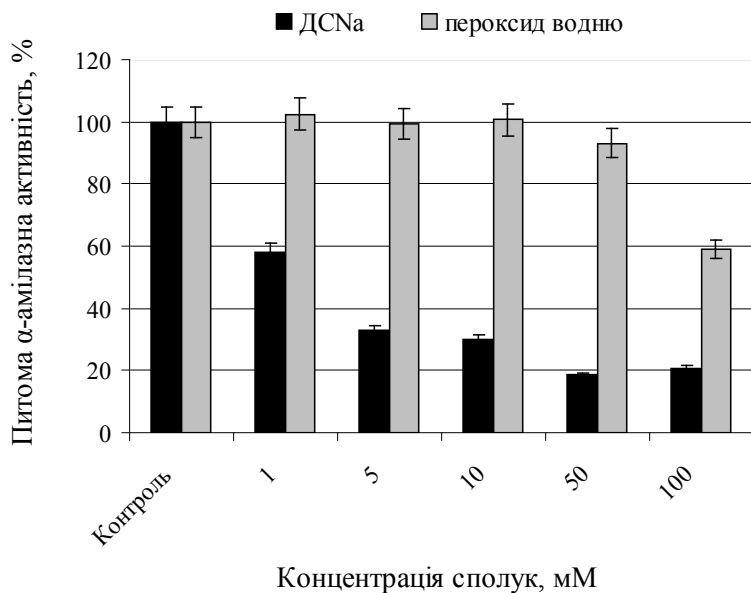


**Рис. 2. Активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a при фотоокисленні метиленовим синім**

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

(пероксиду водню) на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a.

Відомо, що ДСNa зазвичай є сильним інгібітором більшості  $\alpha$ -амілаз, оскільки пригнічує активність ферменту навіть у дуже низьких концентраціях.  $\alpha$ -Амілаза *Achromobacter* sp. 7a, на відміну від раніше вивчених у нашому відділі  $\alpha$ -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147, виявилася більш стійкою до дії даної речовини: у присутності 1, 5 і 10 мМ ДСNa вона зберігала 58, 33 і 20,5 % своєї активності відповідно (рис. 3). Схожі результати були отримані для  $\alpha$ -амілази *B. cereus* GA6, яка при додаванні 0,1 ( $\approx$  3,5 мМ) і 1 % ( $\approx$  35 мМ) ДСNa виявляла 50 і 25 % активнос-



**Рис. 3. Вплив додецилсульфату натрію і перексиду водню на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a**

ті відповідно [16].  $\alpha$ -Амілаза *G. thermoleovorans* була менш чутливою до дії даної речовини, оскільки зберігала 83 і 60 % активності у присутності 0,5 ( $\approx 17,5$  мМ) і 1 % розчину інгібітора [15].

Вивчення впливу іншого аніонного детергенту – дезоксихолевої кислоти показало, що вона істотно впливала на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a: фермент зберігав 24,0–31,5 % і 7 % активності при концентрації реагенту 0,05–0,5 % і 1 % відповідно (рис. 4). Раніше досліджені у нашому відділі  $\alpha$ -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147 були більш стійкими до дії даної речовини, оскільки майже повністю виявляли свою активність навіть у присутності 1 % дезоксихолевої кислоти [1].

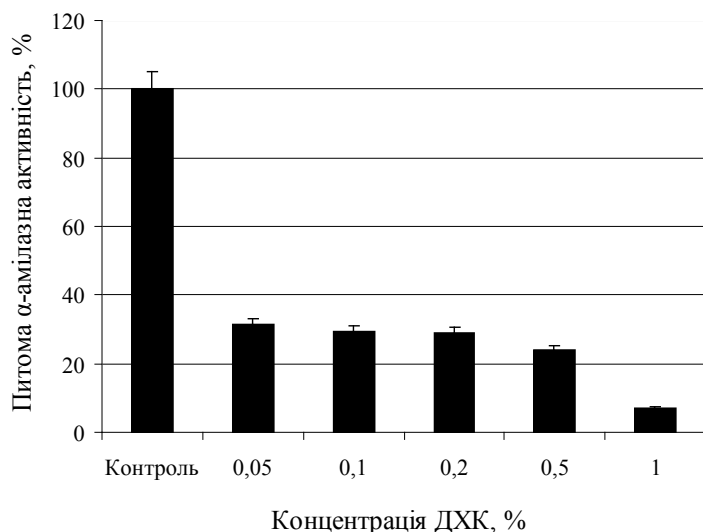


Рис. 4. Вплив дезоксихолевої кислоти на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a

У той же час  $\alpha$ -амілаза *Achromobacter* sp. 7a виявилася більш стійкою до дії неіоногенних детергентів, таких як Тритон X-100 і Твін-20, які часто додають до складу мийних і косметичних засобів. При додаванні Твіну-20 досліджений нами фермент був більш стабільним, оскільки навіть у присутності 10 % розчину зберігав 77 % своєї активності (рис. 5). Більш чутливою  $\alpha$ -амілаза *Achromobacter* sp. 7a була до дії Тритону X-100, оскільки 5 і 10 % сполука викликала зниження активності ферменту до рівня 49 і 28,5 % відповідно (рис. 5). Отримані нами результати були кращими, ніж у випадку  $\alpha$ -амілази *G. thermoleovorans*, яка при додаванні лише 0,6 % Тритону X-100 втрачала 40 % активності [15], та  $\alpha$ -амілази *A. acidocaldarius*, активність якої знижувалася на 20 % у присутності 0,06 % Тритону X-100 [17].

Використання сечовини показало високу стабільність дослідженого ферменту до даного денатуранту (рис. 6): при її концентрації 0,005 до 0,1 М  $\alpha$ -амілаза *Achromobacter* sp. 7a виявляла 95–100 % своєї активності, при концентрації 0,5–4 М – 85,0–87,5 %, лише у присутності 8 М реагенту активність знижувалася до 50 %. Стабільною до дії сечовини виявилася також  $\alpha$ -амілаза *B. cereus* GA6, яка демонструвала 60 і 35 % активності при додаванні 1 і 10 М денатуранту [16]. Активність  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* KIBGE HAS підвищувалася при внесенні 1-5 мМ сечовини [6]. У той же час  $\alpha$ -амілаза *A. acidocaldarius* виявилася взагалі нестійкою до дії сечовини [17].



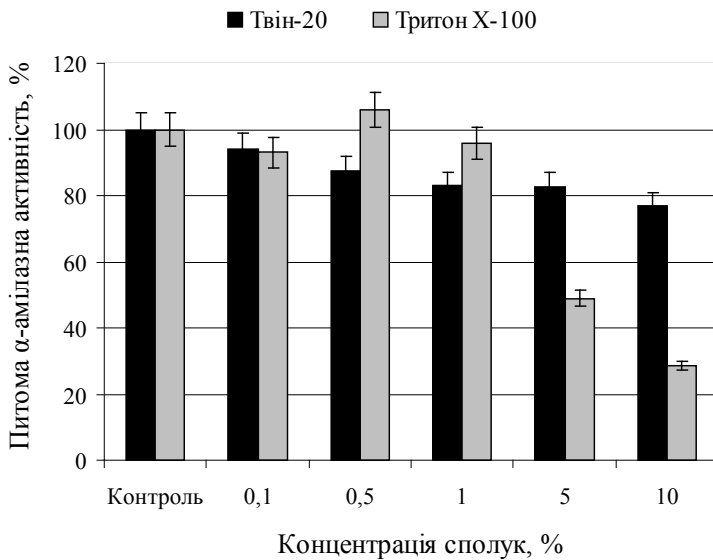


Рис. 5. Вплив Твіну-20 і Тритону X-100 на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a

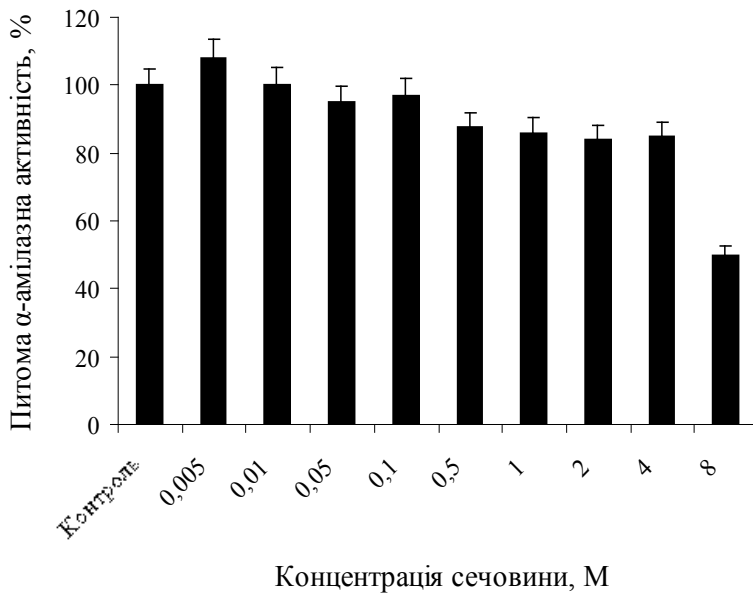


Рис. 6. Вплив сечовини на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a

Важливою умовою використання ферментів при виготовленні екологічно безпечних мийних засобів є їх стійкість до хімічного окиснення. Вивчення впливу пероксиду водню на активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a показало (рис. 3), що досліджений фермент був досить стійким до хімічного окиснення, оскільки зберігав 100 % активності у присутності 0,001–0,01 М окисника і 60 % – при додаванні 0,1 М пероксиду водню. Подібні результати були отримані для  $\alpha$ -амілази *Bacillus* sp. BKL20 [9]. А  $\alpha$ -амілаза *B. cereus* GA6 повністю втрачала свою активність при внесенні 0,01 М пероксиду водню [16].

Отже, вивчення впливу катіонів, аніонів та специфічних хімічних реагентів показало, що  $\alpha$ -амілаза *Achromobacter* sp. 7a є металозалежним ферментом, який містить у своїй структурі іони  $\text{Ca}^{+2}$ . Важливу роль у

ферментативному каталізі даного ферменту відіграють карбоксильні та сульфгідрильні групи, і, на відміну від більшості глікозидаз, не містять імідазольну групу гістидину. Достатньо висока стійкість  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a у присутності ДСNa, сечовини, Твіну-20 і пероксиду водню передбачає можливе її застосування у виготовленні мийних і пральних засобів.

Автори висловлюють подяку проф. Іваниці В.О., який люб'язно надав культуру *Achromobacter* sp. 7a (ОДУ ім. І.І. Мечнікова), та к. б. н. Шепелевич В.В. і Зелений П.П (КНУ ім. Тараса Шевченка) за ідентифікацію культури.

**Е.В. Авдюк, Л.Д. Варбанец**

*Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

### **ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ И ХИМИЧЕСКИХ РЕАГЕНТОВ НА АКТИВНОСТЬ $\alpha$ -АМИЛАЗЫ *ACHROMOBACTER* SP. 7a**

#### **Р е з ю м е**

Изучено влияние катионов и анионов на активность  $\alpha$ -амилазы *Achromobacter* sp. 7a. Показано, что исследованный фермент устойчив к действию большинства анионов, однако чувствителен к ряду катионов. Наиболее существенное ингибирующее влияние на активность  $\alpha$ -амилазы *Achromobacter* sp. 7a оказали ионы  $Hg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Ag^{+}$ . Снижение активности  $\alpha$ -амилазы *Achromobacter* sp. 7a в присутствии ЭДТА и ЭГТА свидетельствует о наличии в их структуре ионов металла. Важную роль в функционировании данного фермента играют карбоксильные и сульфгидрильные группы, о чём свидетельствует его ингибирование 1-[3-(диметиламино)пропил]-3-этилкарбодиимид метиодидом и *n*-хлормеркурибензоатом соответственно.  $\alpha$ -Амилаза *Achromobacter* sp. 7a не содержит в активном центре имидазольную группу гистидина, в отличие от большинства известных гликозидаз. Исследованный фермент проявил высокую устойчивость к Твину-20, мочеvine и перекиси водорода, что делает его конкурентноспособным с ранее описанными  $\alpha$ -амилазами.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:**  $\alpha$ -амилаза, *Achromobacter* sp., ионы металлов, химические реагенты, фотоокисление, детергенты.

**K.V. Avdiyuk, L.D. Varbanets**

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine*

### **THE EFFECT OF METAL IONS AND CHEMICAL REAGENTS ON THE ACTIVITY OF *ACHROMOBACTER* SP. 7a $\alpha$ -AMYLASE**

#### **S u m m a r y**

The effect of cations and anions on the activity of *Achromobacter* sp. 7a  $\alpha$ -amylase was studied. It is shown that tested enzyme is stable to most of anions, however sensitive to a number of cations. The most significant inhibitory effects on the activity of *Achromobacter* sp. 7a  $\alpha$ -amylase exerted  $Hg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Ag^{+}$  ions. Decline of

activity *Achromobacter* sp. 7a  $\alpha$ -amylase in the presence of EDTA and EGTA indicated on the presence within its structure of metal ions. An important role in the functioning of this enzyme play a carboxyl and sulfhydryl groups as evidenced by its inhibition of 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide and p-chloromercuribenzoate respectively.  $\alpha$ -Amylase *Achromobacter* sp. 7a does not contain histidine imidazole group in the active center, unlike most studied glycosidases. The tested enzyme showed high stability in the presence of Tween-20, urea, peroxide of hydrogen, making it competitive with previously described  $\alpha$ -amylases.

**К е у w o r d s:**  $\alpha$ -amylase, *Achromobacter* sp., metal ions, chemical reagents, photooxidation, detergents.

1. Авдіюк К.В.  $\alpha$ -Амілази *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 і *Bacillus subtilis* 147: Автореф. дис. канд. біол. наук. – Київ, 2013. – 24 с.
2. Авдіюк Е.В., Варбанець Л.Д., Сафронова Л.А., Харкевич Е.С. Очистка  $\alpha$ -амилази *Aspergillus flavus* var. *oryzae* и *Bacillus subtilis* и их свойства // Біотехнологія. – 2012. – 5, № 5. – С. 91–99.
3. Варбанець Л.Д., Борзова Н.В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. – К.: Наук. думка, 2010. – 440 с.
4. Мончева П.А., Данова С.Т., Гочева Я., Иванова И.В. Ионы кальция и дифференциация *Streptomyces hygroscopicus* 155, продуцента антибиотического комплекса // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – № 2. – С. 10–14.
5. Bamigbade A.T., Adewale I.O., Bakare M.K. Characterization of a novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus macquariensis* isolated from cassava peels dump site // Am. J. Biochem. – 2014. – 4, N 4. – P. 84–92.
6. Bano S., Lateef M., Iqbal S., Naqvi B., Iqbal L. Role of protein denaturing agents and EDTA on  $\alpha$ -amylase activity from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS // IJPCBS. – 2014. – 4, N 2. – P. 411–415.
7. Ghazi M. Aziz, Hala M. Ali. Purification and characterization of amylase from local isolate *Pseudomonas* sp. SPH4 // J. Biotechnol. Res. Center. – 2012. – 5, N 1. – P. 69–79.
8. Hassan S.A., Ali S.A., Abbasi A., Kamal M. Purification and biochemical characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent, thermostable and acidophilic  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. RM16 // Afr. J. Biotechnol. – 2011. – 10, N 32. – P. 6082–6089.
9. 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. – 56, N 4. – P. 279–288.
10. Kumari N., Jain V., Malhotra S. Purification and characterization of extracellular acidophilic  $\alpha$ -amylase from *Bacillus cereus* MTCC 10205 isolated from soil // Afr. J. Microbiol. Res. – 2013. – 7, N 48. – P. 5440–5448.
11. Machius M., Declerck N., Huber R., Wiegand G. Activation of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase through a disorder-order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium triad // Structure. – 1998. – 6, N 3. – P. 281–292.
12. Mobini-Dehkordi M., Afzal-Javan F. Application of alpha-amylase in biotechnology // J. Biol. Today's World. – 2012. – 1, N 1. – P. 39–50.
13. Mojsov K. Microbial  $\alpha$ -amylases and their industrial applications: a review // IJMIE. – 2012. – 2, N 10. – P. 583–609.

14. Prakash O., Jaiswal N., Pandey R.K. Effect of metal ions, EDTA and sulfhydryl reagents on soybean amylase activity // Asian J. Biochem. – 2011. – 6, N 3. – P. 282–290.
15. Rekadwad B.N. Characterization of amylase from industrially important thermophilic microorganism: *Geobacillus thermoleovorans* strain Rekadwadsis // IJLBPR. – 2015. – 4, N 1. – P. 26–29.
16. Roohi Kuddus M., Saima. Cold-active detergent-stable extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus cereus* GA6: Biochemical characteristics and its perspectives in laundry detergent formulation // J. Biochem. Tech. – 2013. – 4, N 4. – P. 636–644.
17. Satheesh Kumar G., Subhosh Chandra M., Mallaiah K.V., Sreenivasulu P., Yong-Lark C. Purification and characterization of highly thermostable  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* // Biotechnol. Bioprocess Eng. – 2010. – 15, N 3. – P. 435–440.

Отримано 07.09.2015