

УДК 57.083.13+577.152.321\*1

## ОДЕРЖАННЯ І ВЛАСТИВОСТІ $\alpha$ -АМІЛАЗИ З *Bacillus* sp. VKL40

О. І. Кубрак  
В. І. Луцшак

Прикарпатський національний університет ім. В. Стефаника, Івано-Франківськ  
E-mail: lushchak@pu.if.ua

Виділено штам *Bacillus* sp. VKL40, здатний секретувати в середовище культивування  $\alpha$ -амілазу, стабільну за високих температур і лужних значень рН. Оптимізацією умов культивування штаму-продуцента досягнуто найбільшої продукції ензиму. Інтенсивність синтезу  $\alpha$ -амілази не залежала від наявності крохмалю в середовищі культивування й стимулювалася додаванням пептону (0,3%) та дріжджового екстракту (0,2%). Ензим повністю зберігав амілолітичну активність після 30 хв інкубації при 60 і 70 °С.  $\alpha$ -Амілаза виявляла високу активність у широкому діапазоні значень рН — від 6,0 до 11,0 і зберігала активність навіть після 24 год інкубації за цих значень рН. Досліджувана  $\alpha$ -амілаза не активувалась іонами кальцію та іонами інших двовалентних металів (1 мМ), а також не інгібувалася ЕДТА та ЕГТА (1–10 мМ), що може свідчити про відсутність іонів кальцію у структурі її молекули.

**Ключові слова:**  $\alpha$ -амілаза, *Bacillus* sp., алкалостабільність, термостабільність, продукція.

$\alpha$ -Амілаза (1,4- $\alpha$ -D-глюкан глюканогідролаза, ЕС 3.2.1.1) — один з амілолітичних ензимів, який здійснює невпорядковане розщеплення 1,4- $\alpha$ -D-глікозидних зв'язків крохмалю та інших полісахаридів з утворенням суміші лінійних і розгалужених вуглеводів: декстринів, олігосахаридів, мальтози й глюкози в  $\alpha$ -аномерній конфігурації [1, 2]. Ці ензими застосовують у багатьох галузях народного господарства [3, 4]. Їх використовують для отримання цукру та спирту, виготовлення паперу й текстилю [1, 4], утворення адгезивних речовин і оброблення стічних вод [3]. Вони незамінні у хлібопекарстві, пивоварінні та виноробстві [2].  $\alpha$ -Амілази застосовують у біотехнологічних процесах приготування кормів для тварин та харчових добавок для дітей і людей похилого віку [5]. Віднедавна  $\alpha$ -амілази почали використовувати як компоненти екологічно безпечних мийних засобів [3, 6].

Оскільки більшість стадій біотехнологічних процесів проводять за підвищених температур, термостабільність  $\alpha$ -амілаз є необхідною умовою для їх практичного застосування [7]. Використання термостабільних  $\alpha$ -амілаз має низку переваг порівняно із застосуванням термолабільних аналогів: дозволяє уникати забруднення мезофільною мікрофлорою, зменшувати витрати на охо-

дження промислових реакторів і збільшувати загальну швидкість процесів [7, 8]. Стабільні за підвищених температур і лужних значень рН (> 8,0)  $\alpha$ -амілази можуть застосовуватись як компоненти екологічно безпечних мийних засобів, оскільки вони легко утилізуються живими організмами в навколишньому середовищі [3, 6, 9].

Для багатьох індустріальних процесів з використанням  $\alpha$ -амілаз, зокрема у процесі виготовлення пива чи сиропів, бажано уникати додавання кальцію, оскільки він спричинює пошкодження обладнання оксалатом кальцію, псує якість і вигляд продукції [7], а тому потребує додаткових витрат для подальшого видалення [10]. Проте майже всі відомі  $\alpha$ -амілази містять іони кальцію, задіяні у підтриманні структурної цілісності їхніх молекул [11]. Залежність активності алкалофільних  $\alpha$ -амілаз від іонів кальцію перешкоджає використанню їх як компонентів мийних засобів, оскільки останні зазвичай містять хелатуючі агенти [12].

$\alpha$ -Амілази містяться в організмах тварин, рослин, грибів і мікроорганізмів, проте тільки ензими мікробного походження використовують у промисловості [1], оскільки вони стабільніші, ніж рослинні та тваринні  $\alpha$ -амілази, і можуть бути відносно легко отримані завдяки тому, що є позаклітинними

ензимами, які секретуються бактеріями в порівняно дешеві середовища культивування [13]. Як продуценти  $\alpha$ -амілаз із бажаними властивостями у біотехнології часто використовують бактерії роду *Bacillus* [1, 7]. Різні види цього роду займають майже всі існуючі екологічні ніші і продукують ензими з різноманітними властивостями [14].

Досягнення найвищої продукції економічно важливих  $\alpha$ -амілаз з бажаними властивостями — одне з основних завдань наукових досліджень. Надпродукції ензиму можна досягти двома шляхами: генетичними маніпуляціями або оптимізацією умов культивування штаму-продуцента. Створення рекомбінантних штамів — високовартісний і тривалий процес, і часто рекомбінантний штам з посиленою продукцією ензиму нестабільний, тоді як збільшення синтезу ензиму у разі зміни складу живильного середовища чи умов культивування ґрунтується на природній стратегії адаптації мікробів до мінливих умов довкілля [15].

Метою цієї роботи було оптимізувати основні компоненти середовища культивування бактерій *Bacillus* sp. BKL40 для одержання найвищої продукції  $\alpha$ -амілази, стабільної за підвищених температур, лужних значень рН і в присутності хелаторів.

## Матеріали і методи

### Штами і реактиви

У роботі використовували водорозчинний картопляний крохмаль, трис-(гідроксиметиламінометан), хлорид кальцію, фосфат калію (однозаміщений), етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТА) та етиленгліколь-N,N,N'-тетраоцтову кислоту (ЕГТА) («Sigma», США), пептон («Fluka», Німеччина), дріжджовий екстракт («Микроген», Росія). Решта використаних реактивів — вітчизняного виробництва. Усі застосовані в роботі реактиви були найвищого доступного ступеня чистоти.

Як препарат ензиму використовували стабільну за підвищених температур і лужних значень рН позаклітинну  $\alpha$ -амілазу з бактерій роду *Bacillus* штаму BKL40, ізолюваного та ідентифікованого нами як описано раніше [16].

### Оптимізація середовища культивування

Культивування бактерій проводили в живильному середовищі такого складу (% , маса/об'єм): 0,1  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,25  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,1  $\text{NaCl}$ ; 0,2  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,005  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,005  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (рН 6,5) [17]. Мінеральне

середовище доповнювали органічними компонентами: 0,025% -м крохмалем, 0,3% -м пептоном та 0,2% -м дріжджовим екстрактом для досягнення найбільшої продукції ензиму. Інокульоване бактеріями живильне середовище інкубували при температурі 40 °С на орбітальному шейкері Skyline (Литва) при 150 об/хв протягом 24 год.

Для отримання посівного матеріалу (інокуляту) бактерії штаму-продуцента перенесли мікробіологічною петлею у стерильних умовах у колбу Ерленмеєра місткістю 50 мл з 10 мл стерильного живильного середовища і культивували протягом 24 год у зазначених вище умовах.

Одержаний інокулят вносили у стерильних умовах у круглодонні колби місткістю 50, 100 чи 250 мл з 10, 20 чи 50 мл стерильного живильного середовища, відповідно, для отримання основних культур бактерій. Посівний матеріал додавали з розрахунку 0,5% інокуляту (об'єм/об'єм) відносно об'єму середовища. Культивування бактерій проводили протягом 24 год при 40 °С. Під час культивування здійснювали відбір з культур частини середовища культивування для визначення  $\text{OD}_{600}$  (параметра росту бактеріальної культури), концентрації позаклітинних протеїнів та активності  $\alpha$ -амілази.

Вплив крохмалю на продукцію  $\alpha$ -амілази вивчали, додаючи різні концентрації водорозчинного картопляного крохмалю (0–1%) до складу мінерального живильного середовища, доповненого 0,3% -м пептоном і 0,2% -м дріжджовим екстрактом.

Важливість пептону для продукції  $\alpha$ -амілази оцінювали, вносячи різні концентрації пептону (до 1%) до складу неорганічного живильного середовища з 0,025% -м крохмалем і 0,2% -м дріжджовим екстрактом.

Роль дріжджового екстракту для синтезу і секреції  $\alpha$ -амілази досліджували, додаючи його (до 1%) до неорганічного живильного середовища, яке містило 0,025% крохмалю і 0,2% пептону.

### Одержання ензиму та визначення активності $\alpha$ -амілази

Після 24 год культивування бактеріальних культур клітини видаляли центрифугуванням при 8 000 g протягом 15 хв на центрифугу Опн-8 (СРСР). Отримані супернатанти використовували як препарати позаклітинної  $\alpha$ -амілази. Для одержання вищої концентрації протеїну в отриманих ензимних препаратах проводили висолювання сульфатом амонію до досягнення 90%-го насичення. Осаджені протеїни відділяли центрифугуванням

(8000 g, 12 хв), а осаді ресуспендували в великих об'ємах 50 мМ фосфатного буфера (рН 7,0).

Амілолітичну активність визначали модифікованим йодометричним методом, який ґрунтується на зниженні інтенсивності забарвлення комплексу крохмалю — йод унаслідок зменшення концентрації крохмалю за дії  $\alpha$ -амілази [18, 19]. Поглинання цього комплексу реєстрували при довжині хвилі 600 нм на спектрофотометрі Spocol 211 (Німеччина). Активність  $\alpha$ -амілази визначали в суміші (0,5 мл), яка містила 0,25 мл 1%-го розчину крохмалю і 50 мМ фосфатний буфер (рН 7,0).

Перед додаванням препаратів ензимів суміш для реакції нагрівали до температури 40 °С протягом 5 хв. Одночасно з дослідними готували 10 проб калібрувального графіка з різною кількістю 1%-го розчину крохмалю, але без додавання ензиму. Ензимні препарати у дослідні проби додавали з розрахунку, щоб загальний об'єм буфера і препарату ензиму дорівнював 0,25 мл. Після 30 хв гідролізу за температури 40 °С суміш охолоджували протягом 3 хв на льоду для зупинення реакції. Для проведення вимірювання в лінійному діапазоні спектрофотометра всі проби розводили. При цьому з кожної проби відбирали 0,04 мл суміші, змішували з 0,4 мл розчину йоду-йодиду калію (0,025%  $J_2$  в 0,025% КJ) в 0,2 н. HCl і доводили об'єм проби до 2 мл охолодженою дистильованою водою.

Активність  $\alpha$ -амілази розраховували за формулою:

$$Акм = \frac{(C_{вих} - C_{кін}) \cdot V_{пр} \cdot n}{t \cdot V_{преп} \cdot [протеїн]}$$

де  $C_{вих}$  — вихідна концентрація крохмалю у пробах перед реакцією, мг/мл (0,1 мг/мл після розведення проб);  $C_{кін}$  — кінцева концентрація крохмалю у пробах, обчислена за рівнянням калібрувального графіка, мг/мл;  $V_{пр}$  — загальний об'єм проби, мл (2 мл після розведення проб);  $n$  — розведення проб перед вимірюванням (12,5 раза);  $t$  — час гідролізу, хв (30 хв);  $V_{преп}$  — об'єм ензимного препарату, мл;  $[протеїн]$  — концентрація загального протеїну в ензимному препараті, мг/мл.

За одиницю (1 Од) активності  $\alpha$ -амілази приймали кількість крохмалю (мг), розщепленого за 1 хв у даних умовах. Питому активність виражали в перерахунку на 1 мг загального протеїну (Од/мг протеїну).

*Визначення активності та стабільності  $\alpha$ -амілази за різних значень рН*

Вплив величини рН на активність  $\alpha$ -амілази досліджували, визначаючи активність ензиму за різних значень рН. З метою уникнення небажаного впливу аніонів різних буферів використовували 50 мМ суміш цитратного (15 мМ), фосфатного (20 мМ) і трис-(15 мМ) буферів, доведену до різних значень рН (від 4,0 до 12,0) методом титрування соляною кислотою чи гідроксидом калію. З метою підтримання рН суміші для визначення активності  $\alpha$ -амілази 1%-ні розчини крохмалів готували на відповідних буферах для кожного значення рН. Ці ж самі буфери та розчини крохмалів використовували для приготування проб калібрувальних графіків для розрахунку активності  $\alpha$ -амілази за досліджуваних значень рН відповідно до описаного вище.

Визначаючи стабільність  $\alpha$ -амілази за різних значень рН, препарати ензиму змішували з відповідними буферами (аналогічними до буферів, використаних для визначення рН-залежності) та інкубували за кімнатної температури (25 °С) протягом 24 год. Одночасно з дослідними пробами інкубували відповідні кількості кожного буфера у пробах калібрувальних графіків, окремих для кожного значення рН. Перед визначенням залишкової активності  $\alpha$ -амілази всі проби попередньо інкубували протягом 5 хв при 40 °С, а потім змішували з попередньо нагрітими до температури 40 °С 1%-ми розчинами крохмалів, приготованими на цих буферах. Подальші етапи визначення активності проводили згідно з описаною вище методикою.

*Дослідження термостабільності*

Для дослідження термостабільності ензимні препарати  $\alpha$ -амілази (середовища культивування після видалення бактерій) інкубували на водяній бані за температур 60 і 70 °С упродовж 30 хв. Після інкубації денатуровані термолабільні протеїни відділяли центрифугуванням (8000 g, 15 хв) і в отриманих супернатантах визначали концентрацію загального протеїну та активність  $\alpha$ -амілази відповідно до описаного вище.

*Вплив хелаторів*

До суміші для визначення  $\alpha$ -амілазної активності (0,5 мл), яка містила 1%-й розчин крохмалю (0,25 мл) і 50 мМ фосфатний буфер (рН 7,0), додавали розчин ЕДТА та ЕГТА до досягнення кінцевих концентрацій 1 і 10 мМ. Визначення залишкової

активності  $\alpha$ -амілази проводили відповідно до вищенаведеного.

*Вплив катіонів двовалентних металів*

У суміш для визначення активності  $\alpha$ -амілази, яка містила 1% -й розчин крохмалю і 50 мМ фосфатний буфер (рН 7,0), вносили розчини відповідних солей двовалентних металів до досягнення кінцевої концентрації іонів 1 мМ. Визначення залишкової активності  $\alpha$ -амілази проводили згідно з описаним вище. Для дослідження впливу іонів  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  і  $\text{Cu}^{2+}$  використовували хлориди металів, а іони  $\text{Fe}^{2+}$  і  $\text{Ni}^{2+}$  додавали у вигляді сульфатів.

*Визначення концентрації загального протеїну*

Концентрацію загального протеїну визначали методом Бредфорда [20]. Для побудови калібрувального графіка використовували сироватковий бичачий альбумін.

*Статистична обробка результатів*

Статистичну обробку результатів проводили, застосовуючи програму MYNOVA [20]. Дані наведено як середні значення  $\pm$  похибка середнього.

**Результати та обговорення**

*Культивування бактерій*

Бактерії вирощували при температурі 40 °С, оскільки ця температура була оптимальною для росту бактеріальної культури і синтезу  $\alpha$ -амілази у більшості відомих продуцентів  $\alpha$ -амілази з роду *Bacillus* [17, 21, 22]. Секрецію  $\alpha$ -амілази бактеріями-продуцентами реєстрували з настанням експоненційної фази росту бактеріальної культури. Вміст ензиму в середовищі культивування зростає протягом логарифмічної фази росту та досягає максимального значення на 24-й год культивування. При подальшому культивуванні бактерій (до 48-ї год) активність  $\alpha$ -амілази у середовищі культивування не змінювалась (рис. 1). Концентрація позаклітинних протеїнів збільшувалася протягом усього часу культивування. Проте оптична густина суспензії бактерій ( $\text{OD}_{600}$ ) — параметр росту бактеріальної культури — різко знижувалась, починаючи з 9-ї год культивування, оскільки бактеріальні клітини злипалися, незважаючи на інтенсивне перемішування середовища культивування.

Слід зауважити, що такі результати було одержано у разі внесення різної кількості посівного матеріалу (0,5 і 5%, об'єм/об'єм)

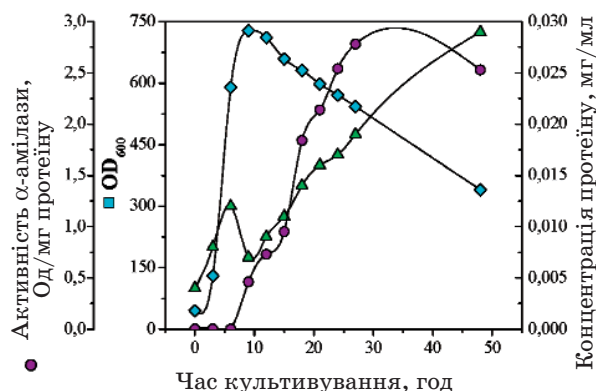


Рис. 1. Ріст бактеріальної культури, накопичення зовнішньоклітинних протеїнів та активність  $\alpha$ -амілази упродовж культивування бактерій *Bacillus* sp. BKL40. Наведено дані типового експерименту

в основні культури. Наші результати добре узгоджуються з даними, отриманими іншими дослідниками, які додавали 1% (об'єм/об'єм) [23], 2% (об'єм/об'єм) [9, 22, 24], 5% (маса/об'єм) [17] або 10% (об'єм/об'єм) [25] інокуляту відносно об'єму основних культур, проте у всіх випадках (незалежно від складу середовища) спостерігали найбільший вміст  $\alpha$ -амілази після 24–48 год культивування бактерій-продуцентів.

*Оптимізація концентрації крохмалю*

Продукція  $\alpha$ -амілази, подібно до інших позаклітинних ензимів, потребує відповідного джерела вуглецю та азоту. Оскільки крохмаль є природним субстратом  $\alpha$ -амілази, секрецію деяких відомих  $\alpha$ -амілаз стимулювали з використанням крохмалю у складі живильного середовища як єдиного джерела вуглецю [26, 27]. Для отримання найбільшої продукції  $\alpha$ -амілази бактеріями роду *Bacillus* використовували живильні середовища з високою концентрацією крохмалю (1%) [21, 22, 25, 28]. У наших експериментах крохмаль концентрацією 1% у середовищі культивування *Bacillus* sp. BKL40 стимулював ріст бактеріальної культури і секрецію позаклітинних протеїнів, проте забезпечував надзвичайно низький вміст  $\alpha$ -амілази серед цих протеїнів (низьку питому активність). Зате  $\alpha$ -амілаза інтенсивно виділялася бактеріями за низької концентрації крохмалю — 0,025%. Продукція  $\alpha$ -амілази бактеріями штаму *Bacillus* sp. BKL40 мала конститутивний характер, ензим виділявся навіть у разі відсутності крохмалю в середовищі культивування (рис. 2). Подібні результати були отримані Z. Konsoula і M. Liakopoulou-Куріакідес [17], найбільшої

продукції  $\alpha$ -амілази бактеріями *Bacillus subtilis* досягали в присутності 0,05% -го крохмалю, а також без додавання крохмалю в живильне середовище.

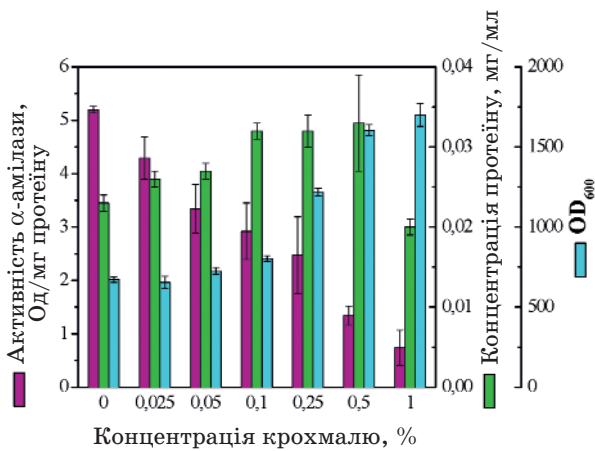


Рис. 2. Вплив різних концентрацій крохмалю на ріст бактеріальної культури, секрецію зовнішньоклітинних протеїнів та активність  $\alpha$ -амілази ( $n = 3$ )

#### Оптимізація концентрації пептону

Синтез  $\alpha$ -амілази залежить від наявності джерела азоту в середовищі культивування [29, 30]. Незважаючи на спроби знайти альтернативні джерела азоту для продукції  $\alpha$ -амілази, як, зокрема, соєва мука [15, 24, 31], м'ясний екстракт [9] та пшеничні висівки [22], найчастіше дослідники використовують пептон і дріжджовий екстракт у різних концентраціях та комбінаціях [9, 32, 33].

З метою отримання найбільшої продукції  $\alpha$ -амілази в живильне середовище додавали різні концентрації пептону (0–1%). У разі культивування бактерій у плоскодонних колбах активність  $\alpha$ -амілази в середовищі культивування зростала зі збільшенням концентрації пептону в ньому від 0 до 0,2%. Подальше збільшення концентрації пептону призводило до зниження вмісту  $\alpha$ -амілази серед інших позаклітинних протеїнів, хоча при цьому досягали найвищих показників росту бактеріальної культури і секреції позаклітинних протеїнів (рис. 3, А). Ці результати відрізняються від результатів С. Teodoro і М. Martins [33] та В. Dettori-Sampurs зі співавт. [34], які отримали найбільшу продукцію  $\alpha$ -амілази, додаючи 1% -й пептон у середовище культивування бактерій роду *Bacillus*. В аналогічних експериментах, але із застосуванням круглодонних колб для культивування бактерій негативний ефект високих концентрацій пептону послаблювався, і максимальний

вміст  $\alpha$ -амілази спостерігався при концентраціях пептону в середовищі культивування 0,3–0,7%. Однак за наявності 1% -го пептону в живильному середовищі активність  $\alpha$ -амілази була на 35% нижчою, ніж у присутності 0,3% -го пептону (рис. 3, В).

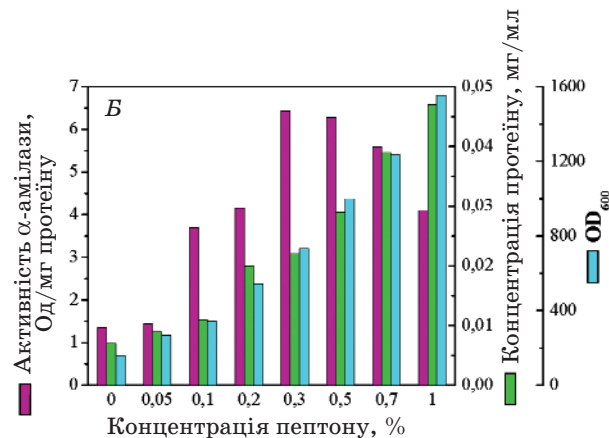
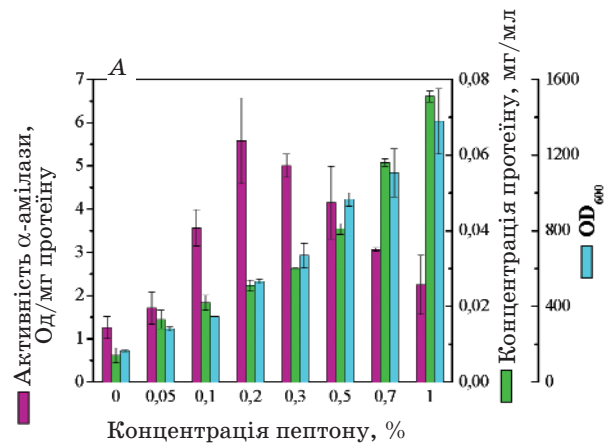


Рис. 3. Вплив різних концентрацій пептону на ріст бактеріальної культури, секрецію зовнішньоклітинних протеїнів та активність  $\alpha$ -амілази.

Культивування проводили в плоскодонних (А) і круглодонних (В) колбах. А — наведено усереднені дані трьох експериментів, В — наведено результати типового експерименту

Колби Ерленмеєра дослідники найчастіше використовують для культивування мікроорганізмів, проте вони не забезпечують належної аерації та перемішування живильного середовища, а ці параметри надзвичайно важливі для продукції позаклітинних ензимів. Подібні небажані ефекти у разі застосування плоскодонних колб були зауважені S. Narang і T. Satyanarayana [35] та J. Uma Maheswar Rao і T. Satyanarayana [10], особливо зі збільшенням відношення об'єму середовища культивування до загального об'єму колби. Тому всі наступні

експерименти ми проводили, використовуючи круглодонні колби.

#### Оптимізація концентрації дріжджового екстракту

Дріжджовий екстракт найчастіше доповнює пептон у складі живильних середовищ для культивування різних мікроорганізмів. Він є важливим фактором синтезу  $\alpha$ -амілази мікробними продуцентами [36]. Дріжджовий екстракт слугував єдиним джерелом азоту для отримання максимальної продукції  $\alpha$ -амілази з *Bacillus* sp. IMD434 [37]. Проте у деяких випадках дріжджовий екстракт не впливав на продукцію  $\alpha$ -амілази бактеріями *Bacillus* sp. [23].

Ми виявили залежний від концентрації ефект дріжджового екстракту на продукцію  $\alpha$ -амілази бактеріями *Bacillus* sp. VKL40 (рис. 4). Збільшення концентрації дріжджового екстракту до 0,2% стимулювало продукцію  $\alpha$ -амілази, проте подальше зростання його концентрації в середовищі культивування мало протилежний ефект. Подібні результати одержали R. Saxena зі співавт. [9], які спостерігали максимальну продукцію  $\alpha$ -амілази бактеріями *Bacillus* sp. PN5 у разі додавання 0,5%-го пептону і 0,3%-го дріжджового екстракту. Слід зазначити, що в наших експериментах дріжджовий екстракт справляв позитивний ефект на ріст бактеріальної культури та продукцію  $\alpha$ -амілази, проте при цьому він майже не впливав на синтез і секрецію позаклітинних протеїнів, концентрація яких не змінювалася за різних концентрацій дріжджового екстракту (за винятком 1%-го).

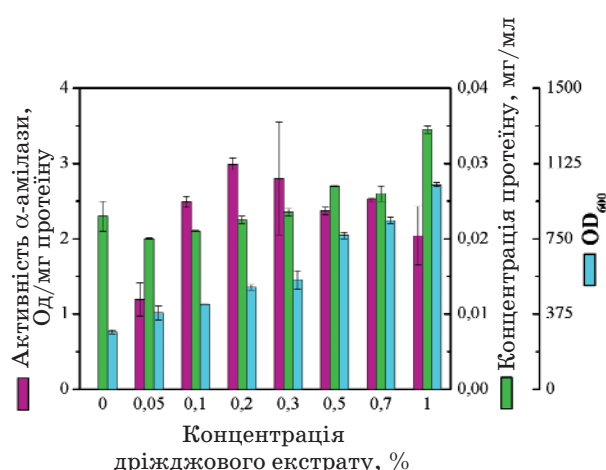


Рис. 4. Вплив різних концентрацій дріжджового екстракту на ріст бактеріальної культури, секрецію зовнішньоклітинних протеїнів та вміст  $\alpha$ -амілази ( $n = 3$ )

#### pH-залежність і pH-стабільність

Незважаючи на наявність багатьох продуцентів  $\alpha$ -амілази серед бактерій роду *Bacillus*, розвиток біотехнології вимагає пошуку нових продуцентів  $\alpha$ -амілаз із бажаними властивостями. Зокрема, відносно новим напрямом використання  $\alpha$ -амілаз є включення їх до складу мийних засобів. Проте для цих потреб можна застосовувати тільки алкалофільні та алкалостабільні ензими [6]. Більшість відомих термостабільних  $\alpha$ -амілаз характеризуються найвищою активністю за нейтральних чи слабнокислих значень з pH-оптимумами при pH 5,5 [25], 6,0 [38] або в межах 5,0–7,0 [24].

Досліджувана нами  $\alpha$ -амілаза з *Bacillus* sp. VKL40 мала однаково високу активність у широкому діапазоні pH — від 6,0 до 11,0 без явного pH-оптимуму (рис. 5, А). Подібний характер pH-залежності виявляла  $\alpha$ -амілаза з термофільного штаму *Bacillus* sp. SMIA-2 [39]. Висока активність за лужних значень pH дозволяє характеризувати  $\alpha$ -амілазу з *Bacillus* sp. VKL40 як алкалофільний ензим. Алкалофільні  $\alpha$ -амілази знайдено в окремих представників роду *Bacillus*. Зокрема, *Bacillus* sp. TS-23 продукував  $\alpha$ -амілазу з pH-оптимумом близько pH 9,0 [8], *Bacillus* sp. PN5 виділяв  $\alpha$ -амілазу, яка виявляла найвищу активність при pH 10,0 [9], а *Bacillus* sp. GM8901 секретував  $\alpha$ -амілазу з pH-оптимумом між 10,0 і 11,0 [6].

Для ензимів, які можуть бути потенційно використані для промислових цілей, украй важливо не тільки мати високу активність за лужних значень pH, але й підтримувати активність упродовж інкубації за цих значень pH. Так, активність  $\alpha$ -амілази з *Bacillus* sp. PN5 не змінювалася після 6 год інкубації за різних значень pH — від 5,0 до 11,0 [9], а активність  $\alpha$ -амілази з *G. thermodenitrificans* HRO10 не зазнавала змін після 24 год інкубації при pH 4,0–9,0 [25]. Використана у наших дослідженнях  $\alpha$ -амілаза з *Bacillus* sp. VKL40 повністю зберігала амілолітичну активність після 24 год інкубації в діапазоні значень pH 7,0–12,0 (рис. 5, Б). Проте досліджуваний ензим втрачав активність під час інкубації за кислих значень pH. Після 24 год перебування при pH 4,0–5,0 активність  $\alpha$ -амілази знижувалася до 6–7% відносно максимального значення. Подібний характер стабільності за різних значень pH типовий для більшості досліджених алкалостабільних  $\alpha$ -амілаз, які нездатні довго підтримувати свою ензимативну активність при pH, нижчих ніж 6,0 [40].

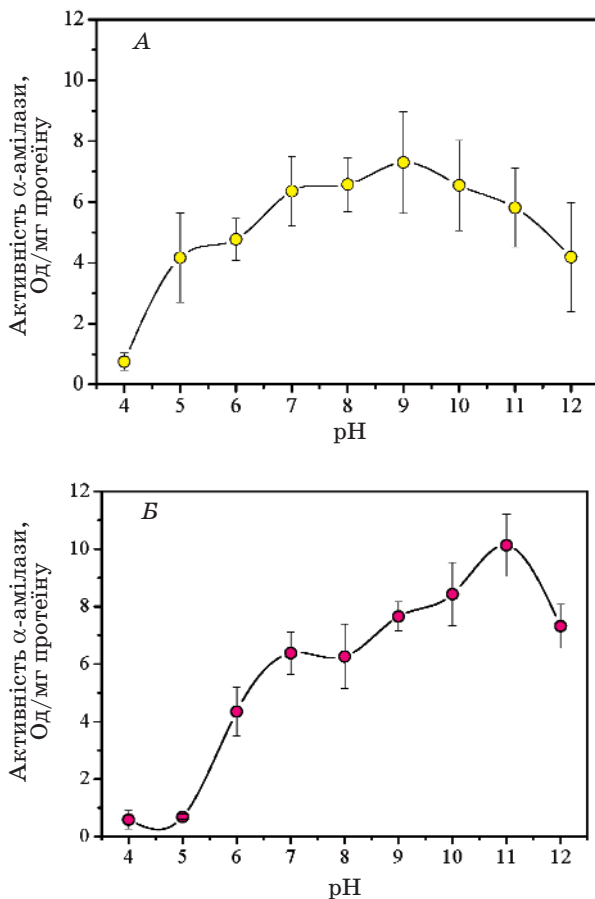


Рис. 5. Вплив величини рН на активність (А) і стабільність (Б)  $\alpha$ -амілази з *Bacillus sp. BKL40* ( $n = 3-5$ )

Термостабільність є критично важливою характеристикою для можливого промислового використання  $\alpha$ -амілаз [7]. Більшість індустріальних процесів проводять при температурах, вищих за 50 °С, оскільки при цьому досягається вища швидкість реакції і знижується ризик бактеріального забруднення продукції [1, 7]. Значну частину наукових робіт присвячено пошуку нових продуктів термостабільних  $\alpha$ -амілаз, у тому числі серед бактерій роду *Bacillus* [8, 9, 25, 39, 41].

Однак для амілолітичних ензимів надзвичайно важливо не тільки виявляти, але й підтримувати високу активність за підвищених температур якомога довше. Зазвичай молекули протеїнів не здатні довго витримувати температуру близько 100 °С у зв'язку з незворотними змінами у структурі їхніх молекул. Тому  $\alpha$ -амілази, які мають найвищу активність за високих температур, швидко втрачають її вже після кількох хвилин перебування за цих температур унаслідок термічної денатурації протеїнових молекул.

Наприклад,  $\alpha$ -амілази з *Bacillus sp. I-3* і *G. thermodenitrificans HRO10* виявляли найвищу швидкість гідролізу крохмалю при 70 і 80 °С відповідно, проте втрачали 30 і 100% своєї активності після 30 хв інкубації за цих температур [24, 25].

Досліджуючи стабільність  $\alpha$ -амілази з *Bacillus sp. BKL40* після 30 хв інкубації при 60 і 70 °С, ми встановили, що її питома активність навіть збільшувалась у 3 й 4 рази (рис. 6). Зростання питомої активності протягом інкубації за підвищених температур частково може пояснюватися денатурацією термолабільних протеїнів у неочищеному препараті досліджуваної  $\alpha$ -амілази (рис. 6).

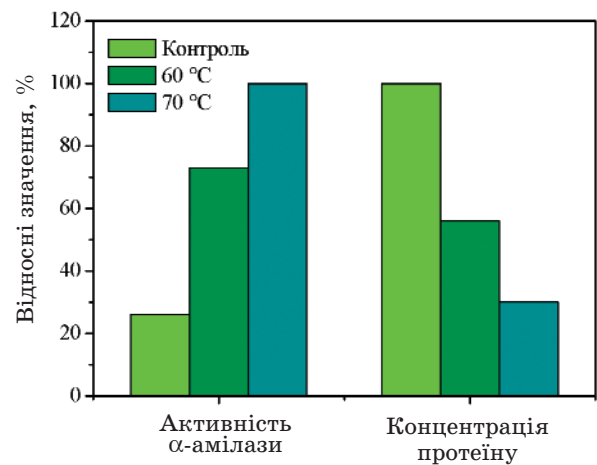


Рис. 6. Термостабільність  $\alpha$ -амілази з *Bacillus sp. BKL40*.

Значення подано як відносні величини щодо відповідних максимальних значень. Наведено дані типового експерименту

#### Вплив хелаторів

Застосування більшості відомих  $\alpha$ -амілаз потребує додавання іонів кальцію, які стабілізують структуру цих ензимів [11]. Залежність активності та стабільності  $\alpha$ -амілаз від іонів кальцію є небажаною у разі використання їх у складі мийних засобів, оскільки останні часто містять сполуки, що здатні хелатувати метали [12]. Окрім цього іони  $\text{Ca}^{2+}$ , додані під час процесу розрідження крохмалю за участю  $\alpha$ -амілази, слід видаляти з продуктів гідролізу за допомогою іонообмінників [10], аби перешкодити формуванню і накопиченню кристалів оксалату кальцію у продуктах та складових частинах ензимерів [7]. Тому на сучасному етапі наукових досліджень у цій царині значний інтерес становить виявлення нових продуцентів термостабільних  $\alpha$ -амілаз, здатних функціонувати в умовах лужних значень рН без додавання іонів кальцію.

Більшість відомих  $\text{Ca}^{2+}$ -вмісних  $\alpha$ -амілаз надзвичайно чутливі до дії ЕДТА [24, 42, 43] та ЕГТА [25]. На відміну від них  $\alpha$ -амілаза з *Bacillus* sp. ВКЛ40 не інгібувалася з додаванням 1 і 10 мМ цих хелаторів (рис. 7).

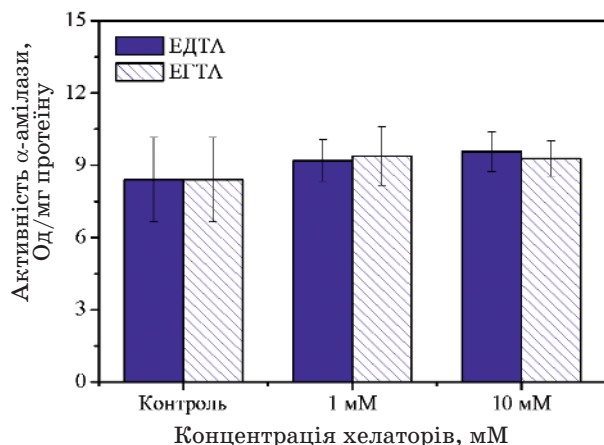


Рис. 7. Вплив хелаторів на активність  $\alpha$ -амілази з *Bacillus* sp. ВКЛ40 ( $n = 3$ )

*Ефект катіонів двовалентних металів*

Ми досліджували вплив катіонів різних двовалентних металів з метою виявити кофактори, які впливають на активність  $\alpha$ -амілази з *Bacillus* sp. ВКЛ40 (табл.). Активність ензиму не змінювалася у присутності 1 мМ всіх досліджуваних катіонів і, зокрема, з додаванням кальцію, на відміну від активності  $\alpha$ -амілаз, отриманих з інших продуцентів [6, 11, 24].

Недоліком  $\text{Ca}^{2+}$ -вмісних  $\alpha$ -амілаз є зниження їхньої активності у присутності певних катіонів через конкурентну взаємодію між доданими катіонами та зв'язаними з протеїновими молекулами [44]. Так, зокрема,  $\alpha$ -амілаза *Bacillus* sp. SMIA-2 інгібува-

лась у разі додавання 1 мМ  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Ba}^{2+}$  [39], а  $\alpha$ -амілаза з *Bacillus* sp. KSM-1378 — з додаванням 1 мМ  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  і  $\text{Hg}^{2+}$  [45]. Відсутність ефекторного впливу іонів двовалентних металів на активність досліджуваної нами  $\alpha$ -амілази може свідчити про відсутність іонів кальцію у структурі її молекули. На сьогодні вже відомі  $\alpha$ -амілази, наприклад  $\alpha$ -амілаза з *Bacillus* sp. KSM-K38 [46], які не містять іонів кальцію у своїй структурі, а тому потенційно можуть бути використані як компоненти мийних засобів.

У результаті проведених досліджень оптимізовано умови культивування *Bacillus* sp. ВКЛ40 для одержання найвищого виходу  $\alpha$ -амілази, стабільної за підвищених температур і лужних значень рН. Найбільшої продукції  $\alpha$ -амілази досягали, використовуючи низькі концентрації крохмалю в середовищі культивування. Продукцію ензиму стимулювали, додаючи у середовище культивування пептон і дріжджовий екстракт; найбільший вихід ензиму спостерігався, коли застосовували 0,3% -й пептон і 0,2% -й дріжджовий екстракт.  $\alpha$ -Амілаза з *Bacillus* sp. ВКЛ40 мала значну термостабільність і повністю зберігала свою активність після 30 хв інкубації при 60–70 °С. Досліджувана  $\alpha$ -амілаза виявляла високу активність за лужних значень рН (9,0–11,0) і зберігала її навіть після 24 год інкубації за цих значень рН. Ензим не інгібувався з додаванням 1 і 10 мМ ЕГТА та ЕДТА і не активувався іонами кальцію. Одержані результати уможливають припущення щодо відсутності іонів кальцію у структурі досліджуваної  $\alpha$ -амілази, що дає переваги цьому ензиму порівняно з більшістю схожих термо- і алкалостабільних, проте  $\text{Ca}^{2+}$ -вмісних  $\alpha$ -амілаз.

Вплив катіонів двовалентних металів на активність  $\alpha$ -амілази з *Bacillus* sp. ВКЛ40

Активність $\alpha$ -амілази, Од/мг протеїну	Катіони двовалентних металів (1 мМ)									
	Конт- роль	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Fe}^{2+}$	$\text{Ba}^{2+}$	$\text{Ni}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Cu}^{2+}$	$\text{Co}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$
	4,95	5,61	5,42	5,81	5,02	5,05	4,62	5,19	5,55	5,54



## ЛІТЕРАТУРА

1. Pandey A., Nigam P., Soccol C. R. et al. Advances in microbial amylases // Biotechnol. Appl. Biochem. — 2000. — V. 31, N 2. — P. 135–152.
2. Van der Maarel M. J. E. C., van der Veen B., Uitdehaag J. C. M. et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family // J. Biotechnol. — 2002. — V. 94. — P. 137–155.
3. Vihinen M., Mantsala P. Microbial amylolytic enzymes // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. — 1989. — V. 24, N4. — P. 329–418.
4. Somers W., Visser J., Rombouts F. M., Riet K. Developments in downstream processing of (poly)saccharide converting enzymes // J. Biotechnol. — 1989. — V. 11, N2–3. — P. 199–222.
5. Kandra L.  $\alpha$ -Amylases of medical and industrial importance // J. Mol. Structure (Theochem). — 2003. — V. 666–667. — P. 487–498.
6. Kim T. U., Gu B. G., Jeong J. Y. et al. Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline  $\alpha$ -amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain GM8901 // Appl. Environ. Microbiol. — 1995. — V. 61, N8. — P. 3105–3112.
7. Haki G. D., Rakshit S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review // Bioresour. Technol. — 2003. — V. 89, N1. — P. 17–34.
8. Lin L. L., Chyau C. C., Hsu W. H. Production and properties of a raw starch-degrading amylase from the thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. TS-23 // Biotechnol. Appl. Biochem. — 1998. — V. 28, N1. — P. 61–68.
9. Saxena R. K., Dutt K., Agarwal L., Nayyar P. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5 // Bioresour. Technol. — 2007. — V. 98, N 2. — P. 260–265.
10. Uma Maheswar Rao J. L., Satyanarayana T. Enhanced secretion and low temperature stabilization of a hyperthermostable and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent  $\alpha$ -amylase of *Geobacillus thermoleovorans* by surfactants // Lett. Appl. Microbiol. — 2003. — V. 36. — P. 191–196.
11. Vallee B. L., Stein E. A., Sumerwell W. N., Fisher E. H. Metal content of amylases of various origins // J. Biol. Chem. — 1959. — V. 234. — P. 2901–2905.
12. Nielsen J. E., Borchert T. V. Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases // Biochim. Biophys. Acta. — 2000. — V. 1543, N2. — P. 253–274.
13. Gupta R., Gigras P., Mohapatra H. et al. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective // Process Biochem. — 2003. — V. 38, N11. — P. 1599–1616.
14. Priest F. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus* // Bacteriol. Rev. — 1977. — V. 41, N3. — P. 711–753.
15. Dey G., Mitra A., Banerjee R., Maiti B. R. Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology // Biochem. Eng. — 2001. — V. 7. — P. 227–231.
16. Кубрак О. І., Луцак В. І. Скринінг штамів *Bacillus* sp. — продуцентів термостабільної амілази // Мікробіол. журн. — 2007. — Т. 69, №5. — С. 26–34.
17. Konsoula Z., Liakopoulou-Kyriakides M. Hydrolysis of starches by the action of an  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* // Process Biochem. — 2004. — V. 39, N11. — P. 1745–1749.
18. Fuwa H. A new method for microdetermination of amylase activity by use of amylose as the substrate // J. Biochem. — 1954. — V. 41, N5. — P. 583–603.
19. Xiao Z., Storms R., Tzang A. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities // Anal. Biochem. — 2006. — V. 351, N 1. — P. 146–148.
20. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — V. 72. — P. 248–254.
21. Mendu D. R., Ratnam B. V. V., Purnima A., Ayyanna C. Affinity chromatography of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* // Enz. Microb. Technol. — 2005. — V. 37, N7. — P. 712–717.
22. Haq I., Ashraf H., Iqbal J., Qadeer M. A. Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium // Bioresour. Technol. — 2003. — V. 87, N1. — P. 57–61.
23. Tanyildizi M. S., Ozer D., Elibol M. Optimization of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology // Process Biochem. — 2005. — V. 40, N7. — P. 2291–2296.
24. Goyal N., Gupta J. K., Sony S. K. A novel raw starch digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch // Enz. Microb. Technol. — 2005. — V. 37, N7. — P. 723–734.
25. Ezeji T., Bahl H. Purification, characterization, and synergistic action of phytate-resistant  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10 // J. Biotechnol. — 2006. — V. 125, N1. — P. 27–38.
26. Lin L. L., Tsau M. R., Chu W. S. General characteristics of thermostable amylopullanases and amylases from the alkalophilic

- Bacillus* sp. TS-23 // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1994. — V. 42, N 1. — P. 51–56.
27. Bajpai P., Bajpai P. High-temperature alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13 // Biotechnol. Bioeng. — 1989. — V. 33. — P. 72–78.
28. Mitsuiki S., Mukae K., Sakai M. et al. Comparative characterization of raw starch hydrolyzing  $\alpha$ -amylases from various *Bacillus* strains // Enzyme Microb. Technol. — 2005. — V. 37, N4. — P. 410–416.
29. Hewitt C. J., Solomons G. L. The production of  $\alpha$ -amylase (E.C.3.2.1.1) by *Bacillus amyloliquefaciens*, in a complex and a totally defined synthetic culture medium // J. Ind. Microbiol. — 1996. — V. 17, N2. — P. 96–99.
30. Hillier P., Wase D. A. J., Emery A. N. Production of  $\alpha$ -amylase (E.C.3.2.1.1) by *Bacillus amyloliquefaciens* in batch and continuous culture using a defined synthetic medium // Biotechnol. Lett. — 1996. — V. 18, N7. — P. 795–800.
31. Soni S. K., Kaur A., Gupta J. K. A solid state fermentation based bacterial  $\alpha$ -amylase and fungal glucoamylase system and its suitability in the hydrolysis of wheat starch // Process Biochem. — 2003. — V. 39, N2. — P. 185–192.
32. Santos E., Martins M. L. L. Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus* sp. // Braz. Arch. Biol. Technol. — 2003. — V. 46, N1. — P. 129–134.
33. Teodoro C. E. D., Martins M. L. L. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. // Braz. J. Microbiol. — 2000. — V. 31. — P. 298–302.
34. Dettori-Campus B. G., Priest F. G., Stark J. R. Hydrolysis of starch granules by the amylase from *Bacillus stearothermophilus* NCA 26 // Process Biochem. — 1992. — V. 27, N1. — P. 17–21.
35. Narang S., Satyanarayana T. Thermostable  $\alpha$ -amylase production by an extreme thermophile *Bacillus thermoleovorans* // Lett. Appl. Microbiol. — 2001. — V. 32, N1. — P. 31–35.
36. Alam S., Hong J., Weigand W. A. Effect of yeast extract on  $\alpha$ -amylase synthesis by *Bacillus amyloliquefaciens* // Biotechnol. Bioeng. — 1989. — V. 33, N6. — P. 780–785.
37. Hamilton L. M., Kelly C. T., Fogarty W. M. Purification and properties of the raw starch degrading  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* sp. IMD 434 // Biotechnol. Lett. — 1999. — V. 21, N2. — P. 111–115.
38. Bessler C., Schmitt J., Maurer K-H., Schmid R. D. Directed evolution of bacterial  $\alpha$ -amylase: Toward enhanced pH-performance and higher specific activity // Prot. Sci. — 2003. — V. 12, N 10. — P. 2141–2149.
39. Cordeiro C. A. M., Martins M. L. L., Luciano A. B. Production and properties of  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. // Braz. J. Microbiol. — 2002. — V. 33, N1. — P. 57–61.
40. Crabb W., Mitchinson E. C. Enzymes involved in the processing of starch to sugars // Trends Biotechnol. — 1997. — V. 5. — P. 349–352.
41. Mamo G., Gashe B. A., Gessesse A. A highly thermostable amylase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. WN11 // J. Appl. Microbiol. — 1999. — V. 86, N4. — P. 557–560.
42. Shaw J. F., Lin F. P., Chen S. C., Chen H. C. Purification and properties of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Thermus* sp. // Bot. Bull. Acad. Sin. — 1995. — V. 36. — P. 195–200.
43. Nielsen A. D., Pusey M. L., Fuglsang C. C., Westh P. A proposed mechanism for the thermal denaturation of a recombinant *Bacillus halmopalus*  $\alpha$ -amylase — the effect of calcium ions // Biochim. Biophys. Acta. — 2003. — V. 1652, N1. — P. 52–63.
44. Levenque E., Janecek S., Hays B., Belarbi A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes // Enzyme Microbiol. Technol. — 2000. — V. 26, N1. — P. 3–14.
45. Igarashi K., Hatada Y., Hagihara H. et al. Enzymatic properties of a novel liquefying  $\alpha$ -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences // Appl. Environ. Microbiol. — 1998. — V. 64, N9. — P. 3282–3289.
46. Nonaka T., Fujihashi M., Kita A., Hagihara H. et al. Crystal structure of calcium-free  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. strain KSM-K38 (AmyK38) and its sodium binding sites // J. Biol. Chem. — 2003. — V. 278, N27. — P. 24818–24824.

**ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА  $\alpha$ -АМИЛАЗЫ  
ИЗ *Bacillus* sp. BKL40***О. И. Кубрак, В. И. Луцк*Прикарпатский национальный университет  
им. В. Стефаныка, Ивано-Франковск*E-mail: lushchak@pu.if.ua*

Изолирован штамм *Bacillus* sp. BKL40, способный секретировать в среду культивирования  $\alpha$ -амилазу, стабильную в условиях высоких температур и щелочных значений pH. Оптимизацией условий культивирования штамма-продуцента достигнута наивысшая продукция энзима. Синтез  $\alpha$ -амилазы не зависел от наличия крахмала в среде культивирования и стимулировался добавлением пептона (0,3%) и дрожжевого экстракта (0,2%). Энзим полностью сохранял амилолитическую активность после 30 мин инкубации при 60 и 70 °C.  $\alpha$ -Амилаза проявляла высокую активность в широком диапазоне значений pH — от 6,0 до 11,0 и сохраняла активность даже после 24 ч инкубации при щелочных значениях pH. Изучаемая  $\alpha$ -амилаза не активировалась ионами кальция и других двухвалентных металлов (1 мМ), а также не ингибировалась ЭДТА и ЭГТА (1 и 10 мМ), что может свидетельствовать об отсутствии ионов кальция в структуре ее молекулы.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -амилаза, *Bacillus* sp., алкало-стабильность, термостабильность, продукция.

**PRODUCTION AND PROPERTIES  
OF  $\alpha$ -AMYLASE FROM *Bacillus* sp. BKL40***О. I. Kubrak, V. I. Lushchak*Vassyl Stefanyk Precarpathian National  
University, Ivano-Frankivsk*E-mail: lushchak@pu.if.ua*

Strain BKL40 was identified as a producer of thermostable alkaline  $\alpha$ -amylase. Maximum production of this  $\alpha$ -amylase was achieved by optimizing culture conditions. Production of  $\alpha$ -amylase seemed to be independent on the presence of starch in the culture medium and was stimulated by peptone (0.3%, w/v) and yeast extract (0.2%, w/v). The enzyme was thermostable and retained amyolytic activity after 30 min of incubation at 60 and 70 °C. High activity was maintained over a broad pH range from 6.0 to 11.0 and the enzyme remained active after alkaline incubation for 24 h. *Bacillus* sp. BKL40  $\alpha$ -amylase was not stimulated by calcium and other bivalent metal cations at 1mM and was not inhibited by EGTA or EDTA at 1-10 mM, suggesting that this  $\alpha$ -amylase does not contain calcium ions in its active site.

**Key words:**  $\alpha$ -amylase, *Bacillus* sp., alkalostability, thermostability, production.