

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.152.321+577.15.08

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ІММОБІЛІЗАЦІЇ α -АМІЛАЗИ З *Bacillus sp.* ВКЛ20 У Ca^{2+} -АЛЬГІНАТНИХ КУЛЬКАХ

О. І. КУБРАК, В. І. ЛУЩАК

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: lushchak@pu.if.ua

Використана методика іммобілізації α -амілази з *Bacillus sp.* в Ca^{2+} -альгінатних кульках. Максимальний вміст іммобілізованої α -амілази одержаний за нейтрального значення рН. З Ca^{2+} -альгінатними кульками зв'язується приблизно така сама кількість α -амілази, що підтверджується також показниками загальної активності (0,05 Од) та зменшенням питомої активності (від 12 до 1 Од/мг протеїну) іммобілізованої α -амілази при додаванні ензимного препарату в кількості 20–160 мкг протеїну до 1 мл 2%-го розчину альгінатів. Активність іммобілізованого ензиму залежить від концентрації альгінатів, використаних для приготування кульок: найбільша активність іммобілізованої α -амілази виявлена за умови використання низьких концентрацій носія (0,15–0,25%). Іммобілізований в Ca^{2+} -альгінатних кульках препарат α -амілази з *Bacillus sp.* ВКЛ20 успішно використано в п'яти повторних циклах гідролізу.

Ключові слова: α -амілаза, *Bacillus sp.*, іммобілізація, Ca^{2+} -альгінатні кульки.

Ензими α -амілази (1,4- α -D-глюкан глюканогідролази, ЕС. 3.2.1.1) каталізують неупорядкований гідроліз внутрішніх 1,4- α -D-глюкозидних зв'язків у полімерах глюкози (амілозі та амілопектині), звільнюючи суміш лінійних і розгалужених вуглеводів: глюкози, мальтози, олігосахаридів і декстринів зі збереженням α -аномерної конфігурації продуктів [1, 2]. Ці ензими широко застосовуються в різних галузях господарства: при виробництві цукру та алкоголю, виготовлення паперу й текстилю [1], для утворення адгезивних речовин і оброблення стічної води [3]. Вони незамінні в хлібопекарстві, пивоварінні та виноробстві [2]. Спектр використання амілолітичних ензимів розширюється з кожним роком [4], а отже – зростає потреба в них, у тому числі в Україні, яка використовує виключно імпортовані препарати амілаз.

Одним із раціональних шляхів вирішення проблеми задоволення зростаючих потреб в α -амілазах є створення іммобілізованих ензимів, які відзначаються низькою перевагою порівняно з неіммобілізованими аналогами: 1 – їх можна багаторазово використовувати, що значно здешевлює ензиматичні процеси у промислових технологіях і підвищує якість контролю за ензиматичними циклами [5–8];

2 – іммобілізація вибірково молекул ензимів на підібраних носіях створює можливість їхнього очищення [5, 9, 10]; 3 – за іммобілізацією можливим є досягнення відповідної конфомації ензиму й субстрату, що допускає кращий контакт між ними [11, 12]; 4 – беззаперечною перевагою іммобілізованих ензимів для індустріального використання є можливість одночасної іммобілізації кількох амілолітичних ензимів на спільному носії [12], і нарешті 5 – іммобілізація сприяє підвищенню активності і стабілізації структури ензимів [9, 11, 13, 14].

Такі суттєві аргументи на користь іммобілізованих ензимів стимулювали науковий пошук у цьому напрямку, тому у другій половині ХХ ст. значна кількість наукових робіт присвячена саме розробленню способів іммобілізації ензимів [5]. Для іммобілізації амілолітичних ензимів використовували методи афінної адсорбції [15], ковалентного зв'язування з носієм [16, 17], утворення поперечних «зшивок» між окремими молекулами ензиму [18] та методи вклячення молекул амілаз всередину гелевих напівпроникних кульок [6, 7, 13, 14].

Слід зауважити, що універсальних, придатних для всіх α -амілаз, методів іммобілізації не існує. Для конструювання іммобілізованого біокатализатора потрібно підбирати відповід-

ний носій та оптимізувати умови іммобілізації (рН, температуру, хімічний склад розчинів, концентрації ензиму та носія, тощо) [5, 11]. Основним завданням залишається вибір відповідного носія, оскільки часто носії модифікують структуру ензиму, порушуючи його функції [9]. Тому для іммобілізації α -амілаз найефективнішими носіями є модифіковані субстрати або їхні хімічні аналоги [15].

Перспективним носієм для іммобілізації амілолітичних ензимів є альгірати – солі альгінових кислот, які складаються з залишків β -D-мануронової (M-залишки) та її епімера по п'ятому атому вуглецю – α -L-гулууронової кислоти (G-залишки). У структурі альгіратів M- і G-залишки утворюють три типи блоків: гомополімерні MM, GG-блоки та гетерополімерні MG-блоки [14]. Альгірати легко желатинуються за нагрівання в надлишку води і загусають у разі додавання іонів двовалентних металів, що зумовлює широке їх використання для іммобілізації амілолітичних ензимів з високою спорідненістю до альгіратів [7, 9, 12, 14, 19]. Однією з найпопулярніших технік іммобілізації α -амілаз з використанням альгіратів як носіїв є включення їх всередину кульок, сформованих альгіратами. Ця методика відрізняється м'якими умовами іммобілізації, відносно простою виконання і порівняно невисокою собівартістю носія, який абсолютно нешкідливий для навколишнього середовища і здоров'я людей [7, 9, 14].

Оскільки різні дослідники використовують дуже відмінні умови іммобілізації для різних амілолітичних ензимів при включенні їх всередину Ca^{2+} -альгіратних кульок, то метою даної роботи є оптимізація умов іммобілізації α -амілаз для одержання іммобілізованого ензиму з максимальною ефективністю.

Матеріали і методи

Штами та реактиви. Використано водорозчинний картопляний крохмаль, імідазол, трис та хлорид кальцію (Sigma, США), натрієву сіль альгінової кислоти – альгірати (Aldrich, США), пептон (Fluka, Німеччина), дріжджовий екстракт (Микроген, Росія). Решта реактивів була вітчизняного виробництва. Всі реактиви найвищого доступного ступеня чистоти.

Як препарат ензиму використовували стабільну за високих температур і лужних рН позаклітинну α -амілазу з бактерій роду *Bacillus* штаму ВКЛ20, виділеного та ідентифікованого нами як описано раніше [20].

Умови культивування та одержання ензиму. Для одержання посівного матеріалу (інокуляту) бактерії штаму-продуцента переносили в стерильних умовах у колбу Ерленмейера ємністю 50 мл, яка містила 10 мл стерильного живильного середовища такого складу (в %, маса/об'єм): KH_2PO_4 – 0,1; Na_2HPO_4 – 0,25; NaCl – 0,1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,005 (рН 6,5) [21] з додаванням 0,3%-го пептону, 0,2%-го дріжджового екстракту і 0,025%-го крохмалю. Інфіковане бактеріями живильне середовище інкубували при 40 °С на орбітальному шейкері Skyline (Литва) при 150 об/хв протягом 24 год.

Для одержання основних культур бактерій-продуцентів у круглодонні колби ємністю 250 і 100 мл з 50 і 20 мл стерильного живильного середовища відповідно, вносили стерильно посівний матеріал. Живильне середовище основних культур відповідало хімічному складу середовища для одержання інокуляту. Посівний матеріал додавали з розрахунку 0,5% (об'єм/об'єм) відносно об'єму середовища основних культур. Культивували бактерії при 40 °С і 150 об/хв протягом 24 год.

Після 24 год культивування бактерії видаляли центрифугуванням при 8000 г протягом 15 хв на центрифугі Опн-8 (СРСР). У відокремлених від бактерій середовищах культивування проводили висолювання сульфатом амонію (до 90%-го насичення) для осадження всіх протеїнів, які в подальшому відділяли центрифугуванням при 8000 г протягом 12 хв. Одержані осадки ресуспендували в невеликих об'ємах 50 мМ імідазольного буфера (рН 7,0) і використовували як неочищені препарати позаклітинної α -амілази.

Вибір оптимального рН для іммобілізації α -амілази. Порошок альгіратів розчиняли в буфері з відповідним рН, який додавали із розрахунку одержання кінцевої концентрації альгіратів 2% (маса/об'єм) після додавання певного об'єму ензиматичного препарату. Для досягнення показників рН у діапазоні 5,5–7,5 використовували 100 мМ імідазольний буфер, а для рН у межах 8,0–11,0 – 100 мМ трис-НСІ-буфер. Для переведення альгіратів у стан гелю розчини желатинували протягом 3–5 хв на водяній бані (100 °С) при постійному перемішуванні. Препарат ензиму додавали до охолодженого розчину альгіратів із розрахунку 12 мкг протеїну на 1 мл 2%-го розчину носія. Для кращого зв'язування ензиму з носієм суміш інкубували при 0–4 °С за постійного перемішування.

Гелеві кульки формували крапанням з медичного шприца (ємність 2 мл або 5 мл) суміші альгінатів з препаратом α -амілази у 6%-й (маса/об'єм) охолоджений (0–4 °С) розчин хлориду кальцію в умовах слабого перемішування на магнітній мішалці. При цьому використовували 5 мл розчину хлориду кальцію для додавання 1,25 мл суміші альгінатів з ензимним препаратом. Для досягнення більшої міцності і жорсткості кульок їх витримували в розчині хлориду кальцію протягом доби при 4 °С. Безпосередньо перед визначенням активності іммобілізованої α -амілази розчин хлориду кальцію зливали, а Ca^{2+} -альгінатні кульки промивали 100-кратним об'ємом дистильованої води.

Підбір оптимальної концентрації альгінатів для іммобілізації α -амілази. Різні наважки порошку альгінатів розчиняли в 100 мМ імідазольному буфері (рН 7,0) для досягнення концентрації альгінатів від 0,15 до 2,5%. Буфер додавали із такого розрахунку, щоб загальний об'єм суміші альгінатів з буфером і препаратом ензиму дорівнював 1,25 мл. Незалежно від концентрації альгінатів додавали 12 мкг ензимного препарату до 1 мл розчину альгінатів.

Підбір оптимальної кількості ензимного препарату для іммобілізації α -амілази. Різну кількість препарату α -амілази додавали до попередньо желатинізованих і охолоджених розчинів альгінатів в 100 мМ імідазольному буфері (рН 7,0) до досягнення 20, 40, 80 і 160 мкг протеїну в 1 мл 2%-го розчину альгінатів. Буфер до порошку альгінатів додавали таким чином, щоб загальний об'єм буфера, препарату ензиму та альгінатів дорівнював 1,25 мл, а кінцева концентрація носія – 2%.

Визначення активності іммобілізованої α -амілази. Амілолітичну активність визначали модифікованим йодометричним методом за зниженням інтенсивності забарвлення комплексу крохмаль-йод внаслідок зменшення концентрації крохмалю за дії α -амілази [22, 23], що реєстрували при довжині хвилі 600 нм на спектрофотометрі Specol 211 (Німеччина). Активність іммобілізованих препаратів α -амілази визначали в 0,5 мл суміші, яка містила 0,25 мл 50 мМ імідазольного буфера (рН 7,0) і 0,25 мл 1%-го розчину крохмалю в такому самому буфері. Перед додаванням іммобілізованого ензиму суміш для визначення активності прогрівали до 40 °С протягом 5 хв. Одночасно з дослідними пробами готували 10 проб для калібрувального графіка з різною кількістю 1%-го розчину крохмалю але без додавання ензиму.

У нагріті до необхідної температури дослідні проби швидко вносили іммобілізований ензимний препарат та інкубували суміш при 40 °С протягом 30 хв за постійного перемішування. Після 30 хв гідролізу крохмалю іммобілізованою α -амілазою для зупинки реакції суміш охолоджували протягом 3 хв на льоді. Для вимірювання в лінійному діапазоні спектрофотометра всі проби розводили: з кожної проби відбирали 0,04 мл суміші, змішували з 0,4 мл розчину йод-йодид калію (0,025% I_2 в 0,025% KJ) в 0,2 н. HCl і доводили об'єм проби до 2 мл охолодженою дистильованою водою.

Концентрацію крохмалю в дослідних пробах після 30 хв ферментації визначали, використовуючи рівняння лінійної регресії, яке відображало лінійну залежність між показниками оптичної густини і концентрацією крохмалю у пробах калібрувального графіка.

Активність іммобілізованого ензиму розраховували за формулою:

$$\text{Акт} = \frac{(C_{\text{вих}} - C_{\text{кін}}) \cdot V_{\text{пр}} \cdot n}{t \cdot n_{\text{преп}}},$$

де $C_{\text{вих}}$ – вихідна концентрація крохмалю у пробах перед реакцією в мг/мл (0,1 мг/мл після розведення проб); $C_{\text{кін}}$ – кінцева концентрація крохмалю у пробах, обчислена за рівнянням калібрувального графіка, мг/мл; $V_{\text{пр}}$ – загальний об'єм проби, мл (2 мл після розведення проб); n – величина розведення проб перед вимірюванням (12,5 раза); t – час гідролізу, хв (30 хв); $n_{\text{преп}}$ – кількість іммобілізованого ензимного препарату, мг.

Кількість іммобілізованого протеїну визначали як різницю між загальною кількістю протеїну у препараті ензиму (добуток об'єму препарату в мл на концентрацію в ньому протеїну в мг/мл), використаному для іммобілізації, і кількістю незв'язаного протеїну, яку визначали в розчині хлориду кальцію після іммобілізації (добуток об'єму хлориду кальцію в мл на концентрацію протеїну в ньому в мг/мл).

Активність неіммобілізованого ензиму розраховували за подібною формулою, використовуючи натомість кількості ензимного препарату ($n_{\text{преп}}$) добуток доданого об'єму препарату ензиму ($V_{\text{преп}}$, мл) на концентрацію загального протеїну ([протеїн], мг/мл) у препараті.

За одиницю (1 Од) активності α -амілази (іммобілізованого чи неіммобілізованого ензиму) брали кількість крохмалю (мг), розщепленого за 1 хв в даних умовах. Питому активність

рахували на 1 мг загального протеїну (Од/мг протеїну). Загальну кількість одиниць активності іммобілізованої α -амілази розраховували як добуток питомої активності на кількість іммобілізованого протеїну.

Визначення операційної ефективності іммобілізованого ензиму. Для визначення кількості можливих повторних використань іммобілізованої α -амілази визначали активність іммобілізованого ензиму після кожного ензиматичного циклу. Іммобілізовані препарати ензиму після 30 хв гідролізу відділяли від суміші, в якій проводили реакцію, промивали двічі 100-кратним об'ємом дистильованої води і висушували на фільтрувальному папері.

Визначення концентрації загального протеїну і статистичне оброблення результатів. Концентрацію загального протеїну визначали методом Бредфорда [24] за інтенсивністю забарвлення комплексу протеїну з барвником Кумасі яскраво-блакитним (G-250). Для побудови калібрувального графіка використовували сироватковий бичачий альбумін.

Статистичне оброблення результатів проводили за програмою MYNOVA [25]. Дані представлено як середні значення \pm похибка середнього.

Результати та обговорення

Техніка іммобілізації амілолітичних ензимів всередині Ca^{2+} -альгінатних кульок є достатньо популярною серед дослідників. Вона апробована в багатьох модифікаціях [7, 9, 12, 14, 19] і продовжує цікавити науковців, особливо протягом останніх років. Цей факт пояснюється перевагами Ca^{2+} -альгінатного носія: відносно його дешевизною, доступністю, простотою приготування і нешкідливістю для живих організмів. Важливим чинником також є можливість поліпшення ефективності іммобілізації вдосконаленням структури носія: наприклад додаванням силікатів [7], змішуванням альгінатів з іншим полісахаридом – хітозаном [14] або утворенням поперечних «зшивок» між молекулами ензиму за допомогою глутарового альдегіду [19].

Проте слід зауважити, що на ефективність іммобілізації ензиму також впливають умови, в яких проводиться зв'язування ензиму та носія (рН, температура, хімічний склад розчинів, концентрація ензиму і носія, тощо) [5, 11]. Так, зокрема, більшість дослідників іммобілізацію α -амілаз в альгінатних носіях проводили без підтримання сталого рН середовища [7, 14, 19], незважаючи на те, що альгінати залежно від типу катіонів, використаних для

утворення солей з альгіновими кислотами, характеризуються рК у межах 3,4–4,4, тому при розчиненні частково закислюють середовище до рН 5,0 [14].

У наших експериментах ефективно зв'язування α -амілази з 2%-ми альгінатними носіями відбувається за близьких до нейтральних значень рН. У разі збільшення рН в діапазон лужних значень вміст іммобілізованої α -амілази зменшується, про що свідчать нижчі показники питомої активності іммобілізованого ензиму (рис. 1). Одержані результати свідчать про вищу афінність α -амілази до альгінатів, які перебувають у слабо дисоційованій формі за нейтрального рН, тоді як перехід альгінатів у повністю дисоційований стан, що відбувається в лужних умовах, знижує процес зв'язування ензиму. Критична важливість рН для зв'язування ензимів з альгінатами також була визначена S. Teotia зі співавторами [26].

Найважливішим чинником при іммобілізації α -амілази шляхом включення всередину Ca^{2+} -альгінатних кульок є концентрація альгінатів. Альгінати з успіхом застосовуються для іммобілізації органел, комплексів ензимів або цілісних клітин [27]. Розміри пор альгінатного носія, які визначаються концентрацією альгінатів, слід мінімізувати у випадку іммобілізації ензимів, для того щоб зменшити втрати ензиму через витік його крізь пори носія [12]. Тому більшість дослідників для формування гелевих кульок використовують достатньо високі концентрації альгінатів за іммобілізації амілолітичних ензимів: 2% [7, 9] і 3% [14].

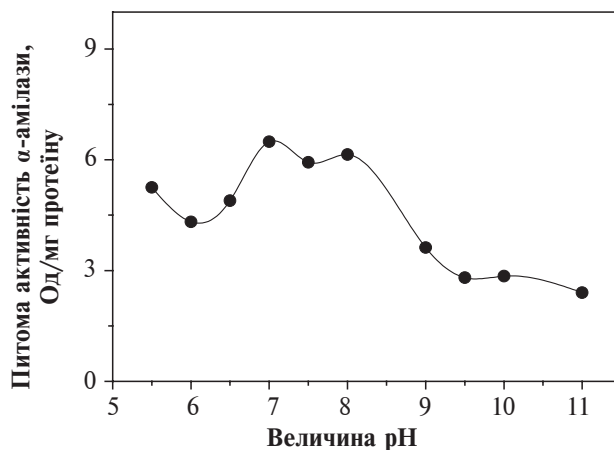


Рис. 1. Підбір оптимальних рН для іммобілізації α -амілази. Для досягнення рН у діапазоні 5,5–7,5 альгінати розчиняли в 100 мМ імідазольному буфері, а для рН у діапазоні 8,0–11,0 в 100 мМ трис-НСІ. Представлено дані одиничного експерименту

При використанні високих концентрацій альгінатів (1,5–2,5%) утворений після желатинування гель є високов'язким, що утруднює виготовлення кульок. Проте сформовані Ca^{2+} -альгінатні кульки характеризуються правильною формою, яка не втрачається за підсушування (рис. 2, Д, Е), тоді як кульки, сформовані 1%-ми або 0,5%-ми альгінатами, легко деформуються при контакті з ними чи за висушування (рис. 2, В, Г). У разі низьких концентрацій альгінатів (0,15–0,25%) для іммобілізації α -амілази сформовані у розчині

хлориду кальцію кульки є настільки тонкими, що відразу деформуються (рис. 2, Б) або навіть руйнуються (рис. 2, А) у процесі відділення їх із розчину хлориду кальцію. Іммобілізовані препарати за таких низьких концентрацій носія повністю висихають, втрачаючи при цьому амілолітичну активність. Саме з цих причин більшість дослідників навіть не апробували альгінати в концентраціях, менших за 1%, для іммобілізації амілолітичних ензимів [9, 14, 19], інші не намагалися визначити активність у деформованих чи зруйнованих кульках, утворе-

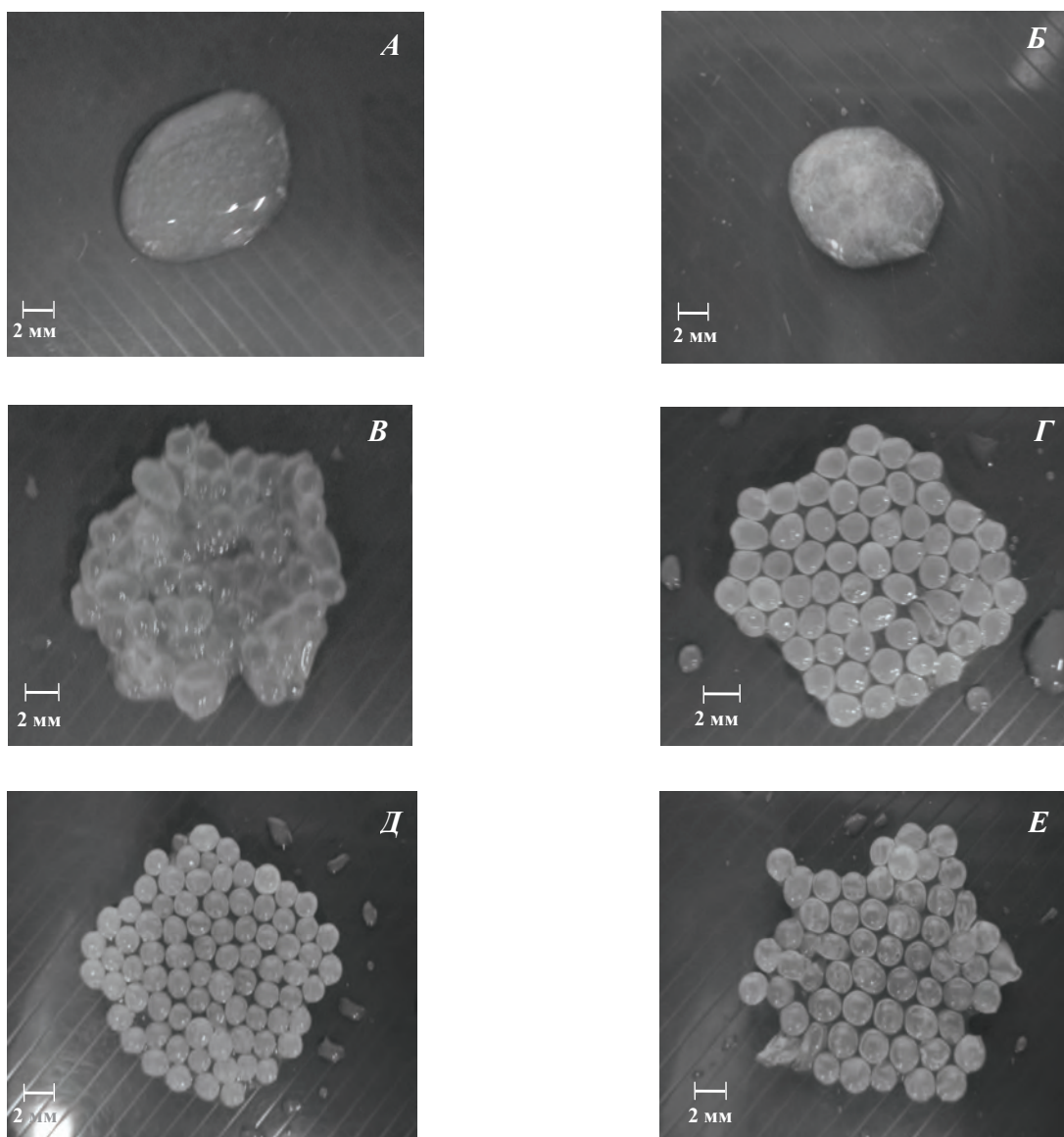


Рис. 2. Загальний вигляд Ca^{2+} -альгінатних кульок з включеними всередину препаратами α -амілази при використанні різних концентрацій альгінатів (% , маса/об'єм): А – 0,15; Б – 0,25; В – 0,5; Г – 1; Д – 1,5; Е – 2. Іммобілізацію здійснювали додаванням розчинів альгінатів різної концентрації з попередньо зв'язаним ензимом у 6%-й розчин хлориду кальцію

них розчинами альгінатів при концентраціях, менших за 0,5% [7]. У той самий час фактично всі автори реєструють нижчу в 1,5 [7] і в 10 раз [9] активність іммобілізованих ензимів, порівняно з неіммобілізованими, при включенні їх всередину товстостінних матриць.

У наших експериментах активність α -амілази, іммобілізованої в Ca^{2+} -альгінатних кульках при концентрації альгінатів 1–2,5%, була майже вдвічі нижчою порівняно з активністю вільного ензиму (рис. 3). Проте в умовах дуже низьких концентрацій альгінатів (0,15–0,25%) іммобілізовані та неіммобілізовані α -амілази за активністю фактично не відрізнялись, однак їхня активність у цьому випадку значною мірою залежала від вологості препарату і різко знижувалася в разі його висихання (рис. 3).

Такий, на перший погляд, парадоксальний результат, коли максимальна активність α -амілази, включеної всередину кульок, досягається при порушенні цілісності кульок, насправді піддається логічному поясненню. За умови низької концентрації носія розміри пор у гелевій матриці великі, що допускає відносно вільний контакт іммобілізованого ензиму з більшою кількістю мономерних ланок великої за розмірами молекули субстрату (крохмалю). Оскільки при цьому більша кількість глюкозних залишків займає комплементарні сайти зв'язування субстрату в молекулі α -амілази, розташовані поблизу активного центру (сайту), то утворюється стабільний ензим-субстратний комплекс, який знижує енергію розриву глюкозидних зв'язків [28]. Висока амілолітична активність α -амілази навіть за умови деформації чи руйнування кульок також може пояснюватися адсорбцією α -амілази на поверхні альгінатної матриці за рахунок взаємодії між доменом зв'язування субстрату в молекулі ензиму [29] і подібною до субстрату структурою альгінатів.

Властивість амілаз вибірково зв'язуватися з альгінатними носіями успішно використовується для очистки α -амілази з *Aspergillus oryzae* протягом процесу іммобілізації шляхом включення ензиму всередину альгінатних кульок [9] та для очистки β -амілази з солодкої картоплі шляхом афінного осадження ензиму з альгінатами [10]. Проте, якщо для амілаз із грибів та рослин альгінати слугують макроафінними лігандами, то бактеріальні амілази характеризуються надзвичайно низькою здатністю зв'язуватися з молекулами альгінатів або взагалі не зв'язуються з ними [9]. Одержані нами результати свідчать про здатність альгі-

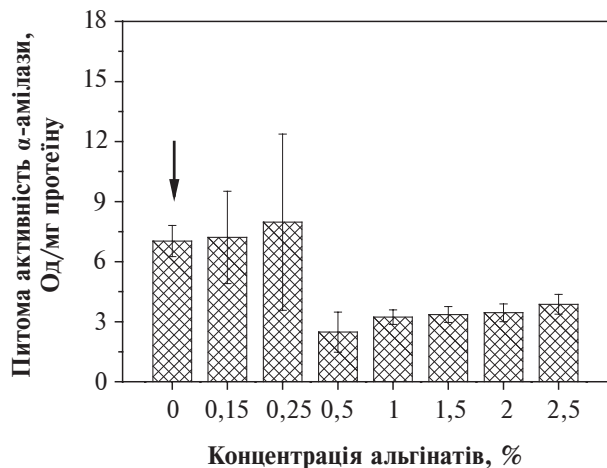


Рис. 3. Залежність питомої активності іммобілізованої α -амілази від концентрації альгінатів, які розчиняли в 100 мМ імідазольному буфері (рН 7,0) для досягнення 0,15–2,5% кінцевих їх концентрацій (додавали 12 мкг білка препарату ензиму до 1 мл розчину альгінатів). Для порівняння наведена активність неіммобілізованого ензиму (вказано стрілкою), $n = 3-4$

натів зв'язуватися з молекулами досліджуваної α -амілази, оскільки навіть за руйнування цілісності альгінатних кульок іммобілізований препарат α -амілази має високу питому амілолітичну активність.

Слід зауважити, що при використанні 0,15% і 0,25% альгінатів для іммобілізації α -амілази з носієм зв'язується близько 20% протеїну від загальної кількості, використаної для іммобілізації (рис. 4). Проте висока питома активність α -амілази одержаних іммобілізованих препаратів свідчить про вищий відносний вміст α -амілази серед іммобілізованих протеїнів (рис. 3). Збільшення концентрації альгінатів, використаних для виготовлення кульок, від 0,5 до 2,5% призводить до зростання вмісту іммобілізованих протеїнів від 34 до 55% (рис. 4), однак при цьому протеїни препаратів таких ензимів включаються в кульки неселективно, що підтверджується низькою питомою активністю цих іммобілізованих препаратів. S. Teotia з колегами [10] підтверджують здатність альгінатів зв'язуватися з молекулами β -амілаз із різних рослинних об'єктів: солодкої картоплі, ячменю і сої за умов низьких концентрацій розчину альгінатів (до 0,5%).

У наших експериментах навіть за умови інкубації препарату α -амілази в розчині альгінатів протягом 30 хв при температурі 0–4 °С і перемішуванні (для забезпечення ефективного зв'язування молекул ензиму з молекулами

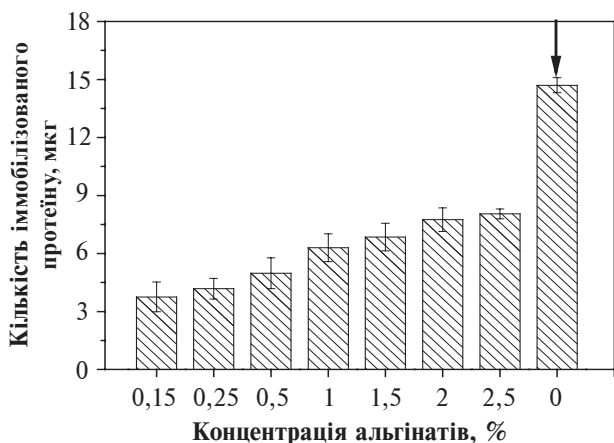


Рис. 4. Залежність кількості включеного всередину кульок протеїну препарату α -амілази від концентрації альгінатів. Кількість іммобілізованого протеїну всередині 1,25 мл альгінатів визначали як різницю між загальною кількістю протеїну у препараті ензиму (добуток об'єму препарату в мл на концентрацію протеїну в ньому в мг/мл), доданого до 1,25 мл альгінатів (позначено стрілкою), і кількістю незв'язаного протеїну, визначеною в розчині хлориду кальцію після іммобілізації, $n = 3-4$

носія перед утворенням Ca^{2+} -альгінатних кульок) іммобілізувало не більше половини від загальної кількості протеїну використаного препарату (рис. 4). Решту протеїну з препарату ензиму виявляли в розчині хлориду кальцію, який використовували для формування кульок. При цьому препарат ензиму додавали із розрахунку 12 мкг загального протеїну на 1 мл розчину альгінатів, незалежно від концентрації розчину альгінатів, на противагу іншим дослідженням, в яких додавали щонайменше в 10 разів вищі кількості: близько 0,6 мг α -амілази з *A. oryzae* на 1 мл 3%-го розчину альгінатів з хітозаном [14], по 3 мг α -амілази з *A. oryzae*, *Bacillus licheniformis* і сорго на 1 мл 2%-го розчину альгінатів [9]. Проте ефективна іммобілізація великої кількості ензиму спостерігалася виключно у випадку використання очищених препаратів α -амілази з *A. oryzae*, оскільки цей препарат має високу афінність до альгінатів [9].

Якщо використовувати препарати α -амілази з *Bacillus sp.* VKL20, то додавання більше ніж 20 мкг протеїну на 1 мл 2%-го розчину альгінатів зумовлює зниження питомої активності (у перерахунку на 1 мг зв'язаного протеїну) іммобілізованого ензиму (рис. 5, А). При цьому загальна активність іммобілізова-

ної α -амілази (добуток питомої активності на кількість іммобілізованого протеїну) при додаванні 20 мкг ензиму до 1 мл 2%-го розчину альгінатів тільки на 30% нижча порівняно з загальною активністю іммобілізованої α -амілази після додавання 160 мкг ензиму, що свідчить про іммобілізацію приблизно однакової кількості α -амілази незалежно від доданої до альгінатів кількості (рис. 5, А). Слід зазначити, що незалежно від кількості доданого препарату і відсотка зв'язаної α -амілази при додаванні різної кількості препарату α -амілази відбувається іммобілізація близько 70% загального протеїну, тоді як решта опиняється у розчині хлориду кальцію (рис. 5, Б).

Однією з беззаперечних переваг іммобілізованих ензимів, порівняно з вільними, незв'язаними з носіями, є можливість багаторазового використання іммобілізованих біокатализаторів, що не тільки надає можливість здешевити ензимні процеси у промислових масштабах, але й дозволяє підвищити якість контролю за ензиматичними циклами [5-8]. Досліджувані нами препарати іммобілізованої α -амілази в Ca^{2+} -альгінатних кульках зберігали амілолітичну активність протягом п'яти ензиматичних циклів, по 30 хв кожний (рис. 6). Активність α -амілази, іммобілізованої в кульках з низькою концентрацією альгінатів (0,25%), навіть збільшується при проходженні циклів гідролізу. Проте використовувати багаторазово препарати з низькими концентраціями носія достатньо складно, оскільки при кожному наступному використанні все більша його кількість перетворюється в безформні дрібні частинки, які легко втрачаються при відбиранні частини суміші для визначення активності чи відмиванні іммобілізованого препарату після завершення кожного ензиматичного циклу. Тому використання таких іммобілізованих ензимів потребує подальшого вдосконалення способу іммобілізації для підтримання структури й збереження цілісності іммобілізованих препаратів.

Стабільність іммобілізованих ензимів — надзвичайно важливий параметр для повторного їх використання. Так, у разі використання α -амілази з *Bacillus subtilis*, іммобілізованої в 2%-х альгінатних кульках, операційна ефективність ензиму (кількість утворених продуктів протягом циклу гідролізу) різко знижується після повторних використань. Ензим виявляє близько 50% операційної ефективності після третього ензиматичного циклу і 30% — після восьмого [7]. Подібні результати було одержано при повторному використанні іммобілізованої

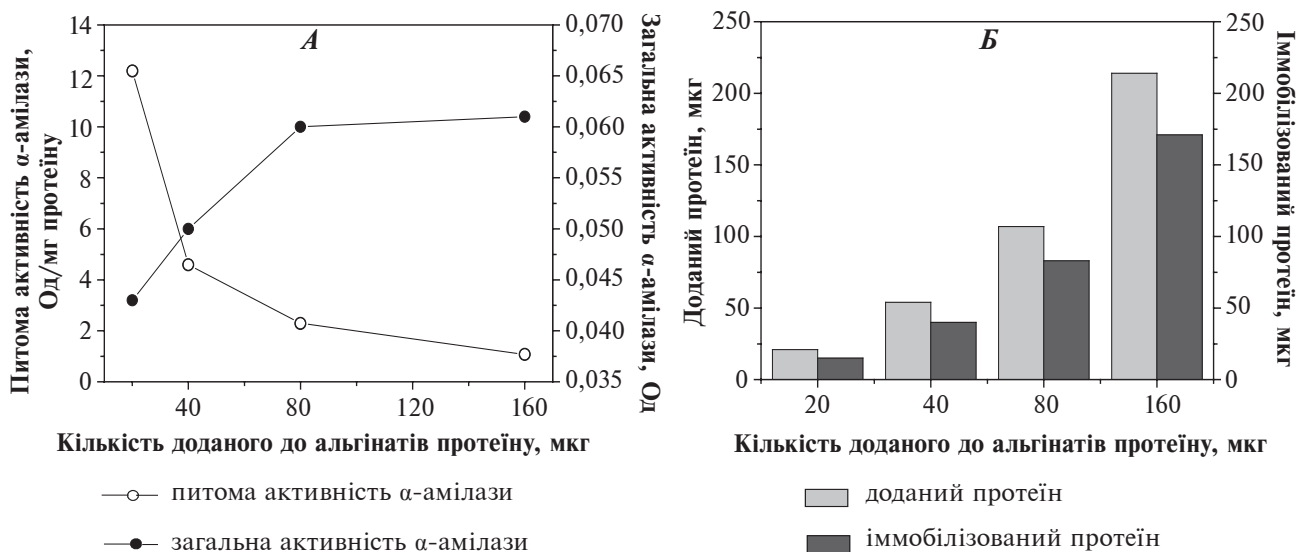


Рис. 5. Залежність питомої та загальної активності іммобілізованої α -амілази (А) та її кількості, включеної всередину кульок (Б), від кількості доданого ферменту. Кількість ферменту розраховано як добуток об'єму його препарату в мл на концентрацію в ньому протеїну в мг/мл і представлено в перерахунку на 1 мл 2%-го розчину альгінатів. Наведено дані типового експерименту

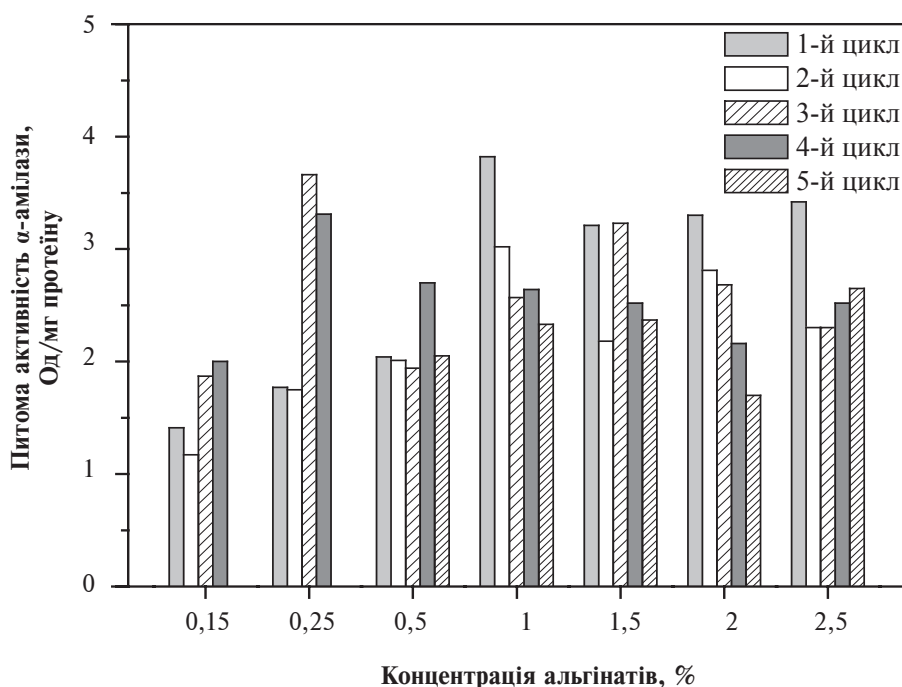


Рис. 6. Операційна ефективність препаратів α -амілази, іммобілізованої в Ca^{2+} -альгінатних кульках, у разі використання альгінатів в різних концентраціях. Для визначення кількості можливих повторних використань іммобілізованої α -амілази вимірювали активність іммобілізованого ферменту після кожного ензиматичного циклу. Наведено дані типового експерименту

β -галактозидази в Ca^{2+} -альгінатних кульках: після сьомого повторного використання фермент виявляє тільки 21% своєї активності відносно активності після першого ензиматичного цик-

лу [19]. При повторному використанні іммобілізованого ферменту важливе значення має не тільки концентрація альгінатів, але й присутність додаткового цементуючого структури ку-

льок агента (SiO_2) [7], «зшивання» глутаровим альдегідом молекул ензиму з лектинами перед іммобілізацією в Ca^{2+} -альгінатних кульках [19] і навіть розмір Ca^{2+} -альгінатних кульок [9].

Отже, проведена успішна спроба іммобілізації α -амілази з *Bacillus* sp. BKL20 у Ca^{2+} -альгінатних кульках. З'ясовано, що активність іммобілізованого ензиму залежить від концентрації альгінатів, використаних для приготування кульок: максимальна питома активність іммобілізованої α -амілази одержана при використанні низьких концентрацій альгінатів (0,15–0,25%), тоді як при збільшенні концентрації альгінатів (до 0,5–2,5%) вона складає близько половини активності неіммобілізованого препарату. α -Амілаза з *Bacillus* sp. BKL20 відзначається низькою афінністю до альгінатного носія, оскільки незалежно від кількості доданого препарату ензиму у всіх випадках іммобілізується до 70% протеїнів відносно доданої кількості. При цьому з Ca^{2+} -альгінатними кульками зв'язується приблизно однакова кількість α -амілази, що підтверджується подібними значеннями загальної активності (Од) та зменшенням питомої активності (Од/мг протеїну) при додаванні різної кількості ензимного препарату до альгінатів.

ОПТИМІЗАЦІЯ УСЛОВІЙ ИММОБИЛІЗАЦІЇ α -АМИЛАЗИ *Bacillus* sp. BKL20 В Ca^{2+} - АЛЬГИНАТНИХ ШАРИКАХ

О. І. Кубрак, В. І. Луцк

Прикарпатський національний університет імені
Василя Стефаника, Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: lushchak@pu.if.ua

Использован метод иммобилизации α -амилазы *Bacillus* sp. в Ca^{2+} -альгінатних шариках. Максимальное количество иммобилизированной α -амилазы получено при нейтральных значениях pH. С Ca^{2+} -альгінатними шариками связывается приблизительно одинаковое количество α -амилазы, о чем свидетельствуют похожие значения общей активности (~0,05 Ед) и уменьшение удельной активности (от 12 до 1 Ед/мг протеина) иммобилизованной α -амилазы при добавлении разного количества препарата энзима (от 20 до 160 мкг протеина) на 1 мл 2%-го раствора альгінатов. Активность иммобилизованного энзима зависит от концентрации альгінатов, использованных для изготовления шариков: наивысшая активность иммобилизованной α -амилазы получена при условии использования низких концентраций

носителя (0,15–0,25%). Иммобилизованная в Ca^{2+} -альгінатных капсулах α -амилаза *Bacillus* sp. BKL20 успешно использовалась на протяжении пяти повторных циклов гидролиза.

Ключевые слова: α -амилаза, *Bacillus* sp., иммобилизация, Ca^{2+} -альгінатные шарики.

OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR IMMOBILIZATION OF α -AMYLASE FROM *Bacillus* sp. BKL20 IN Ca^{2+} -ALGINATE BEADS

O. I. Kubrak, V. I. Lushchak

Vassyl Stefanyk Precarpathian National
University, Ivano-Frankivsk, Ukraine;
E-mail: lushchak@pu.if.ua

Summary

The method of α -amylase from *Bacillus* sp. immobilization by an entrapment in Ca^{2+} -alginate beads has been performed in the paper. Maximum content of immobilized α -amylase was observed at neutral pH values during immobilization. The approximately equal quantities of α -amylase were entrapped into Ca^{2+} -alginate beads, that was confirmed by the similar total activity (~ 0.05 U) and declining specific activity (from 12 to 1 U/mg protein) of immobilized α -amylase after the addition of different amounts of enzyme preparation (from 20 to 160 mg of protein) to 1 ml of 2% alginate solution. Alginate concentration affected the activity of immobilized enzyme, maximum α -amylase activity was observed at low concentrations of the carrier (0.15–0.25%), used to prepare beads. α -Amylase, entrapped in Ca^{2+} -alginate beads, was successfully tested during five hydrolysis cycles.

Key words: α -amylase, *Bacillus* sp., immobilization, Ca^{2+} -alginate beads.

1. Pandey A., Nigam P., Soccol C. R. et al. // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2000. – 31. – P. 135–152.
2. Van der Maarel M. J. E. C., van der Veen B., Uitdehaag J. C. M. et al. // J. Biotechnol. – 2002. – 94. – P. 137–155.
3. Vihinen M., Mantsala P. // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. – 1989. – 24. – P. 329–418.
4. Кубрак О. І., Луцк В. І. // Мікробіол. журн. – 2007. – 69, № 6. – С. 56–76.
5. Cao L. // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2005. – 9. – P. 217–226.
6. Chang M.-Y., Juang R.-S. // Enzyme Microb. Technol. – 2005. – 36. – P. 75–82.
7. Konsoula Z., Liakopoulou-Kyriakides M. // Process Biochem. – 2006. – 41. – P. 343–349.

8. *Reshmi R., Sanjay G., Saganum S.* // *Catal. Commun.* – 2006. – **7**. – P. 460–465.
9. *Kumar R. S. S., Vishwanath K. S., Singh S. A., Rao A. G. A.* // *Process Biochem.* – 2006. – **41**. – P. 2282–2288.
10. *Teotia S., Khare S. K., Gupta M. N.* // *Enzyme Microb. Technol.* – 2001. – **28**. – P. 792–795.
11. *Mateo C., Palomo J. M., Fernandez-Lorente G. et al.* // *Ibid.* – 2007. – **40**. – P. 1451–1463.
12. *Roy I., Gupta M. N.* // *Ibid.* – 2004. – **34**. – P. 26–32.
13. *Sankalia M. G., Mashru R. C., Sankalia J. M., Sutariya V. B.* // *Int. J. Pharm.* – 2006. – **312**. – P. 1–14.
14. *Sankalia M. G., Mashru R. C., Sankalia J. M., Sutariya V. B.* // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2007. – **65**. – P. 215–232.
15. *Liao Y.-C., Syu M.-J.* // *Biochem. Eng. J.* – 2005. – **23**. – P. 17–24.
16. *Betancor L., Lypez-Gallego F., Hidalgo A., et al.* // *Enzyme Microb. Technol.* – 2006. – **39**. – P. 877–882.
17. *Hasirci N., Aksoy S., Tunturk H.* // *React. Funct. Polym.* – 2006. – **66**. – P. 1546–1551.
18. *Habibi A. E., Khajeh K., Naderi-Manesh H.* // *J. Biotechnol.* – 2006. – **123**. – P. 434–442.
19. *Haider T., Husain Q.* // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2007. – **41**. – P. 72–80.
20. *Кубрак О. І., Лушак В. І.* // *Мікробіол. журн.* – 2007. – **69**, № 5. – С. 26–34.
21. *Konsoula Z., Liakopoulou-Kyriakides M.* // *Process Biochem.* – 2004. – **39**. – P. 1745–1749.
22. *Fuwa H.* // *J. Biochem.* – 1954. – **41**. – P. 583–603.
23. *Xiao Z., Storms R., Tzang A.* // *Anal. Biochem.* – 2006. – **351**. – P. 146–148.
24. *Bradford M. M.* // *Ibid.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
25. *Brooks S. P. J.* // *Biotechniques.* – 1992. – **13**. – P. 906–911.
26. *Teotia S., Lata R., Khare S. K., Gupta M. N.* // *J. Mol. Recognit.* – 2001. – **14**. – P. 295–299.
27. *Konsoula Z., Liakopoulou-Kyriakides M.* // *Enzyme Microb. Technol.* – 2006. – **39**. – P. 690–696.
28. *Kandra L., Gyémánt G., Remenyik J. et al.* // *FEBS Lett.* – 2002. – **518**. – P. 79–82.
29. *Mitsuiki S., Mukae K., Sakai M. et al.* // *Enzyme Microb. Technol.* – 2005. – **37**. – P. 410–416.

Отримано 29.08.2008