

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ БЕТА-АМИЛАЗЫ *BACILLUS POLYMYXA*

А.З. ГАСПАРЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. АБОВЯН

Получена иммобилизованная бета-амилаза из штамма *Bacillus polymyxa* на силихроме С-80 методом ковалентного связывания. Определены оптимальные условия каталитической активности иммобилизованного фермента: рН 6,8; 45°; $K_m=1,25$ мг/мл (по крахмалу), $V_{max}=0,048$ мг/мин (по мальтозе). Полученный биокатализатор в течение 10 суток сохраняет 80-85% исходной активности при 40-45°. Осуществлен процесс получения мальтозы с помощью иммобилизованной бета-амилазы в проточных условиях из 10 %-ного раствора разжиженного крахмала, 0,5 ДЭ, рН 6,8, 45°, с удельной скоростью 0,25 ч⁻¹. Выход мальтозы 75 % от использованного субстрата.

Կոփակման կատարելիս սերոտի С-80 սիլիկոտի վրա ստացվում է *Bacillus polymyxa* շտամի իմոբիլիզացված բետա-ամիլազը: Որպեսզի կոնդիցիոնները հերմենտի կատալիտիկ ակտիվության օպտիմալ արդյունքները ստանանք: $K_m=1,25$ մգ/մլ (ստար), $V_{max}=0,048$ մգ/վրկ (մալտոզ): Ստացված բիոկատալիզատորը 10 օրվա ընթացքում արևադարձում է սկզբնական ակտիվության 80-85 % 40-45°-ում: Անընդհատ ելույթին արդյունքներում իմոբիլիզացված բետա-ամիլազի կիրառմանը իրականացվում է մոլային անոցումը 10% չրիկացված օսլայի լուծույթի, 0,5 ԳՄ, рН 6,8, 45°, անստիարաթ արագությունը 0,25-1 ժամում: Կոփակման օպտիմալում հաճախ մալտոզի ելքը կազմում է 75%:

The immobilized beta-amylase of *Bacillus polymyxa* was obtained on the silochrom C-80 by method of covalent binding. The optimal conditions of the catalytic activity of the immobilized enzyme were determined: pH 6,8; 45°; $K_m=1,25$ mg/ml of starch, $V_{max}=0,048$ mg/min of maltose. The obtained biocatalyst after 10 days at 40-45° conserved 80-85 % of original activity. The process of maltose production has been realized by immobilized beta-amylase in continuous-flow conditions from 10 % of liquefied starch, 0,5 DE, pH 6,8, 45° , at space velocity of 0,25 h⁻¹ . The yield of maltose was 75% the substrate used.

Иммобилизация - силихром С-80 - бета-амилаза-мальтоза

Для иммобилизации бета-амилазы применяются практически все известные методы иммобилизации ферментов [2,4,6,7,10]. Полученные препараты иммобилизованной бета-амилазы имеют неудовлетворительную стабильность [11]. В настоящей работе представлены результаты работ по иммобилизации бета-амилазы и ее применения для получения мальтозы в непрерывных условиях.

Материал и методика. В качестве препарата бета-амилазы (α -1,4-глюканмальтогидролаза, КФ 3.2.1.2) использовали аффинно-очищенный и подробно изученный фермент из штамма *Bacillus polytuxa* [1]. Исходная активность препарата 1,68 ед/мг белка (единица активности соответствует количеству фермента, необходимого для образования 1 мкмоль мальтозы из растворимого крахмала (1%) за 1 мин).

Для иммобилизации бета-амилазы был применен метод ковалентного связывания на силихроме С-80. Активирование силихрома осуществляли обработкой его гамма-аминопропилтриэтоксисиланом, затем глутаровым альдегидом по методике [8]. Носитель промывали на фильтре дистиллированной водой и использовали для иммобилизации.

Иммобилизацию бета-амилазы на активированном силихроме проводили перемешиванием смеси раствора фермента и носителя в течение 5ч при температуре 18-20°. Затем иммобилизованный фермент промывали холодной дистиллированной водой до полного исчезновения белка в промывных водах.

Белок определяли по методу Лоури.

Определение активности иммобилизованной бета-амилазы проводили в реакционной смеси, содержащей: 1 г иммобилизованного препарата в 1 мл 1/15 М фосфатного буфера, рН 7,0, и 4 мл 1 %-ного раствора растворимого крахмала при 45° в условиях постоянного перемешивания в течение 1 часа. Активность иммобилизованной бета-амилазы рассчитывали по количеству образовавшейся мальтозы в мкмольях на 1 г носителя в течение 1 часа.

Получение мальтозы в непрерывных условиях проводили в биореакторе сплошного заполнения с вытеснением. Раствор частично гидролизованного крахмала подвзали в биореактор снизу вверх.

Анализ редуцирующих веществ проводили методом Шомодьи-Нельсона [5,9]. Мальтозу идентифицировали тонкослойной хроматографией (ТСХ) в системе *n*-бутанол - уксусная кислота - вода (4:3:3), в качестве проявителя используя анилинфталат, а также высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) на приборе НРР-4001 (Чехословакия) в колонке SEPARON SGX-NH₂ (150 x 3,3 мм). В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил - вода (70:30), скорость - 2 мл/мин и в качестве детектора - дифференциальный рефрактометр [3].

Результаты и обсуждение. Иммобилизацию бета-амилазы осуществляли добавлением 200 мл раствора фермента (7,56 мг/мл белка с исходной активностью 1,68 ед/мг белка) на 200 г активированного носителя с перемешиванием при 20° 5ч. (табл. 1)

Таблица 1: Иммобилизация бета-амилазы *B. polytuxa* на силихроме С-80 (условия: 20°; постоянное перемешивание на качалке (160 об/мин); исходный белок 7,56 мг/мл; исходная активность 1,68 ед/мг белка)

Время, час	Связанный белок, м.г/г носителя	Активность, ед/мг белка (мкмоль мальтозы/мин/мг белка)	Активность, ед/г носителя (мкмоль мальтозы/час/г носителя)
1,5	2,5	0,34	16,4
3,0	6,3	1,01	356,4
5,0	6,3	1,01	356,4

Данные табл.1 показывают что полученный носитель в условиях эксперимента за 3ч связывает 6,3 мг белка, а активность в иммобилизованном состоянии 1,01 ед/мг белка или 356,4 ед/г носителя, т.е. сохраняется 60 % исходной активности. Дальнейшее увеличение времени контакта (5ч) не приводило к изменениям.

Исследование зависимости активности иммобилизованной бета-амилазы от температуры и pH показало, что макс.мальнап каталитическая активность иммобилизованного фермента проявляется в интервале температур 40-60° оптимум 45° (табл.2), и в интервале pH 6,5-7,5, оптимум 6,8, с достаточно высокой активностью в области pH 6,0-8,5 (табл.3)

Таблица 2. Влияние температуры на активность иммобилизованного фермента (условия: 1 г препарата, 5 мл 1%-ного крахмала; pH 6,8; 160 об/мин; 1 ч)

Температура, °С	Относительная активность, %
30	60
40	56
45	100
50	100
60	58
70	50
75	35
80	10

Таблица 3. Влияние pH на активность иммобилизованного фермента (Условия: 1 г препарата; 4 мл 1%-ного крахмала, 1 мл буфера (0,2М ацетатный буфер pH 4-6; 1/15М фосфатный буфер pH 6-8; 0,2М NaOH- глициновый буфер pH 8,5-10), 160 об/мин, 1 ч)

pH	Относительная активность, %
4,5	35
5,5	55
6,0	82
6,5	96
6,8	100
7,0	100
7,5	98
8,0	84
8,5	62
9,0	33
10,0	0

Полученные результаты в целом идентичны с таковыми для нативного фермента [1].

Исследования кинетики реакции гидролиза при различных концентрациях субстрата выявило, что по сравнению с нативным ферментом, при котором K_m равна 1,1 мг/мл (по крахмалу), а V_{max} - 0,061 мг/мин (по мальтозе) [1], у иммобилизованного фермента несколько увеличивается K_m - 1,25 мг/мл (по крахмалу) и соответственно уменьшается V_{max} - 0,048 мг/мин (по мальтозе). Небольшая разница в значениях K_m иммобилизованного и нативного фермента, вероятно, зависит от носителя, который своеобразно препятствует приближению субстрата к ферменту. Такое явление наблюдалось у иммобилизованной на хитозане бета-амилазы, выделенной из сои, когда K_m нативного фермента - 0,26 мг/мл, а K_m иммобилизованного фермента - 37,0 мг/мл (по крахмалу) [12].

Стабильность иммобилизованной бета-амилазы при различных температурах определяли в проточных условиях в течение 10 суток в колонке (2 x 20 см), через которую пропускали 10 %-ный раствор крахмала, частично разжиженного альфа-амилазой (0,5 ДЭ), pH 6,8, с удельной скоростью 0,2 ч⁻¹ (табл.4.).

Таблица 4. Стабильность иммобилизованной на силихроме С-80 бета-амилазы В. ролутуха при различных температурах (условия: колонки (2x20 см); 10 %-ный раствор крахмала; 0,5 ДЭ, pH 6,8; SV=0,2ч⁻¹)

Время, сутки	Остаточная активность, %		
	40°	45°	55°
1	100	100	100
2	100	100	91
3	100	100	83
4	100	100	72
5	100	100	65
6	100	97	50
7	97	95	34
8	95	90	17
9	90	86	8
10	85	80	0

Полученные результаты показали, что иммобилизованный фермент проявлял достаточно высокую стабильность при температурах 40-45°.

В условиях эксперимента время полужизни иммобилизованной на силихроме бета-амилазы при температурах до 45° составляло около 50 суток.

Получение мальтозы с помощью иммобилизованной бета-амилазы в проточных системах осуществляли следующим образом. Колонку заполняли иммобилизованным ферментом и через него пропускали 10 %-ный раствор крахмала с 0,5 ДЭ, разжиженный альфа-амилазой. С успехом могут быть использованы удельные скорости до 0,25 ч⁻¹, приводящие к максимальным выходам мальтозы (табл. 5).

Таблица 5. Влияние удельной скорости на образование мальтозы (условия: 10 %-ный раствор крахмала, 0,5 ДЭ, рН 6,8, 45°)

Удельная скорость, SV ч ⁻¹	Выход мальтозы, %
0,10	70
0,20	75
0,25	75
0,30	65
0,35	60
0,40	53

Полученный раствор обесцвечивали активированным углем (4г на 1,0 л раствора) при 60-70° в течение 20 мин и фильтровали. С целью получения мальтозы пищевого назначения раствор выпаривали досуха, а реактивного назначения - концентрировали при 50° до насыщения ($d=1,1-1,3$) и кристаллизовали при 10-15° 48 часов. Далее фильтровали и высушивали. В проточных условиях с помощью иммобилизованной на силихроме бета-амилазы из *B.polytuxa* получается мальтоза с выходом 75% от использованного крахмала.

Выполнение данной работы частично финансировалось грантами МНФ (Соробла) RY 1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3572.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 *Газарян А.В., Абелян В.А., Африжян Э.К.* Биохимия, 57, 6, 856-861, 1992
- 2 *Ковачанко Т.И., Гулюк Н.Г., Гусаков А.Б., Синицын А.П.* Пищ.пром., 9, 32-34, 1988.
- 3 *Hokse H.J.* Chromatography, 169, 98-100, 1980
- 4 *Kokufuta E., Shimizu N., Tanaka H., Nakamura I.* Biotech Bioeng., 32, 6, 756-759, 1988
- 5 *Nelson N.G.* J. Biol. Chem., 153, 375-380, 1944.
- 6 *Ohba R., Ueda S.* Biotech. Bioeng., 24, 2137-2154, 1980
- 7 Patent GB 2131812A, 1984
- 8 *Robinson P.J., Dunnill P., Lilly M.D.* Biotech. Bioeng., 15, 606, 1973
- 9 *Somogyi M.A.* J. Biol. Chem., 195, 19-23, 1952
- 10 *Takasaki Y., Yamanobe T.* Rept. Ferm. Res. Inst., 52, 1-9, 1979.
- 11 *Ulbrich R., Goibik R., Schellenberger A.* Biotech Bioeng., 37, 3, 280-287, 1991
- 12 *Yoshida M., Oishi K., Kimura T., Ogata M., Nakakuki T.* Agric. Biol. Chem., 53, 3139-3142, 1989.

Поступила 7.IX.1994