

АКТИВНІСТЬ АМІЛОЛІТИЧНИХ ЕНЗИМІВ

Анотація. У роботі досліджено активності ензимів амілолітичної дії *Amylex 4T* та *Diazyme SSF* за умов використання електрохімічно активованої води для приготування субстрату та розчину ензиму. Проведено порівняння активностей ензимів у присутності католіту, аноліту, їх суміші (1:1) відносно контролю (дистильованої води). Встановлено, що електрохімічно активовану воду доцільно використовувати у процесах гідролізу крохмалевмісних субстратів, оскільки вона сприяє підвищенню активності ензимів.

Ключові слова: ензим, активність ферментів, α -амілаза, глюкоамілаза, етанол, католіт, аноліт

Pankiv N., Palianytsia L., Berezovska N., Kosiv R.

ACTIVITY OF AMYLOLYTIC ENZYMES

Summary. The activity of enzymes amylase activity *Amylex 4T* and *Diazyme SSF* using an electrochemically activated water for preparation of substrate and enzyme solution were investigated in this work. Comparison of enzyme activities in the presence of catholyte, anolyte, their mixture (1:1) relative to control (distilled water) were performed. It was established that electrochemically activated water should be used in hydrolysis process of starch substrates because it increased the activity of enzymes.

Keywords: enzyme, activity of enzymes, α -amylase, glucoamylase, ethanol, catholyte, anolyte

1. Вступ

Амілолітичні ензими, які здійснюють перетворення крохмалю, становлять значну частку серед інших промислових ферментних препаратів. Це зумовлено їх широким використанням у багатьох галузях промисловості, зокрема у фармацевтичній, легкій, харчовій, у виробництві мийних засобів тощо [2,10,15,19]. Вони забезпечують одержання харчових продуктів з покращеними смаковими показниками, ферментованих напоїв, глюкозо-фруктозних сиропів, пива, етанолу [12, 14, 18].

За механізмом дії амілолітичні ензими характеризуються такими особливостями.

α -Амілаза здійснює неупорядковане розщеплення α -1-4-глікозидних зв'язків крохмалю та інших полісахаридів з утворенням декстринів, олігосахаридів, мальтози і глюкози в α -аномерній конфігурації [6]. Цей ензим належить до ендоамілази.

Глюкоамілаза (амілоглюкозидаза) – екзоензим кінцевої дії, що каталізує гідроліз як α -1,4-, так і α -1,6-зв'язків у полі- та олігосахаридах. Послідовно відщеплюючи від нередукуючих кінців ланцюгів один глікозидний залишок за іншим, глюкоамілаза забезпечує майже повний гідроліз полі-та олігосахаридів до β -глюкози.

Відмінність між ендоамілазами порівняно з гідролізом полі- і олігосахаридів екзоамілазами полягає в тому, що у першому випадку гідроліз відбувається зі збереженням конфігурації продуктів реакції та супроводжується трансглікозилюванням, в другому – з обертанням конфігурації [1].

Субстратами для дії амілолітичних ферментів є крохмаль – рослинний полісахарид, який складається з амілози (15–30%) і амілопектину (70–85%).

Обидва компоненти неоднорідні, їхня молекулярна маса знаходиться у широких межах й залежить від природи крохмалю. Тому це має значний вплив на активність амілолітичних ензимів і створює труднощі при вивченні механізму їхньої дії. Крім цього, у виробничих умовах, зазвичай, використовують рослинну сировину, яка, крім крохмалю, містить й інші речовини, що можуть впливати як на механізм дії ензимів, так і на їхню активність.

Загалом на активність ферментів впливає багато чинників, основними з яких є природа субстрату, його концентрація, температура, концентрація гідроген-іонів тощо. У роботах [5] експериментальним шляхом було досліджено вплив різних фізико-хімічних чинників на конформацію макромолекули глюкоамілази та пов'язаних з нею механізмів активації й інактивації цього ензиму.

До основних способів активації та стабілізації промислових амілолітичних ензимів у технології спирту належать фізичні та хімічні. Так, використання ультразвуку дозволяє скорочувати тривалість термоферментативного оброблення зернових замісів, знижувати температуру процесу та зменшувати витрати препаратів ензимів [4,7]. Внесення солей Ca^{+2} сприяє збереженню активності ферментних препаратів та їх стабілізації [11,13]. Запропоновані методи все ж потребують оброблення всього середовища ультразвуковими хвилями, або ж додавання до нього хімічних речовин. Оскільки до компонентів субстрату, крім крохмалю та олігосахаридів входить і вода, то її склад та властивості також впливатимуть на активність амілолітичних ферментів. Відомо, що під час електролізу води з незначним сольовим складом одержується електрохімічно

активована вода, яка має особливі фізико-хімічні властивості та проявляє біологічні ефекти [3,9].

Тому розроблення ефективних способів збереження активності амілолітичних ензимів під час гідролізу полі- та олігосахаридів у водних середовищах є перспективним завданням у напрямку інтенсифікації технологічних процесів.

Мета роботи: дослідження амілолітичної та глюкоамілазної активностей Amylex 4T та Diazyme SSF за умов використання електрохімічно активованої води для приготування субстрату та розчину ензиму.

2. Матеріали і методи

Об'єктами досліджень вибрано ферментні препарати Amylex 4T та Diazyme SSF (фірми Danisco), які серед інших промислових ензимів виявилися ефективнішими на стадії термоферментативного оброблення зернових замісів у технології етилового спирту. Характеристика цих препаратів згідно даних виробника представлена у таблиці 1.

Таблиця 1
Характеристика Amylex 4T та Diazyme SSF

Назва	Активність	pH	Температура, °C
Amylex 4T	24540 LU/г	4,0÷7,0	60÷100
Diazyme SSF	368±8 GAU/г	3,0÷5,0	30÷65

Джерело: [16,17]

Amylex 4T – ферментний препарат термо-стабільної α -амілази, одержаний шляхом глибинного культивування штаму бактерій *Bacillus licheniformis*. Diazyme SSF – джерело глюкоамілази. Його продуцентом є *Aspergillus niger*. До складу препарату входить протеаза.

Дослідження амілолітичної активності проводили згідно СОУ 15.9-37-241:2005 [8]. Альфаамілазна активність (АЗ) визначалася здатністю амілолітичних ензимів каталізувати гідроліз крохмалю до декстринів різної молекулярної маси та виражалася числом одиниць АЗ в 1 г або в 1 см³ ферментного препарату. Глюкоамілазна активність (ГЛЗ) визначалася здатністю амілолітичних ензимів ката-

лізувати гідроліз мальтози з утворенням глюкози і виражалася числом одиниць ГЛЗ в 1 г або в 1 см³ ферментного препарату.

Католіт та аноліт одержували в електролізері Ековод ЕАВ-3К шляхом електролізу водопровідної води.

3. Результати дослідження активностей ензимів

Для дослідження активностей ензимів використовували такі зразки води: католіт, аноліт та їх суміш у співвідношенні 1:1, а також дистильована вода як контроль. Значення pH та окисно-відновного потенціалу зразків води наведені у таблиці 2.

Таблиця 2
Значення pH та окисно-відновного потенціалу зразків води

Вода	pH	ОВП, мВ
Католіт	9,6÷10,7	(-184,8)÷(-239,9)
Аноліт	2,93±3,33	181,6÷203,6
Католіт+аноліт (1:1)	6,1±7,41	(-41,5)÷(+21,5)
Дистильована	7,47±8,43	(-53,5)÷(-103,6)

Джерело: за результатами експериментальних досліджень

Спочатку досліджували вплив субстрату на активності Amylex 4T та Diazyme SSF. Для цього готували розчини крохмалю (α -амілази) і мальтози (для глюкоамілази) на основі електрохімічно активованої (аноліт, католіт, суміш католіту та аноліту у співвідношенні 1:1) та дистильованої води. Досліджувані препарати ензимів розводили дистильованою водою та вносили у вищезазначені субстрати. Контролем у цих варіантах слугував зразок, де і субстрат, і розчин ферментного препарату готували на дистильованій воді. Значення pH приготування субстратів для визначення амілолітичної та глюкоамілазної активностей наведені на рис. 1.

Результати досліджень показали неоднаковий вплив зразків води на альфаамілазну та глюкоамілазну активності ензимів Amylex 4T та Diazyme SSF. Так, використання католіту та суміші католіту з анолітом у співвідношенні 1:1 для приготування субстрату сприяє підвищенню альфаамілазної активності ферментного препарату Amylex 4T на 93,51 % і 5,97 % відповідно. Аноліт у складі суб-

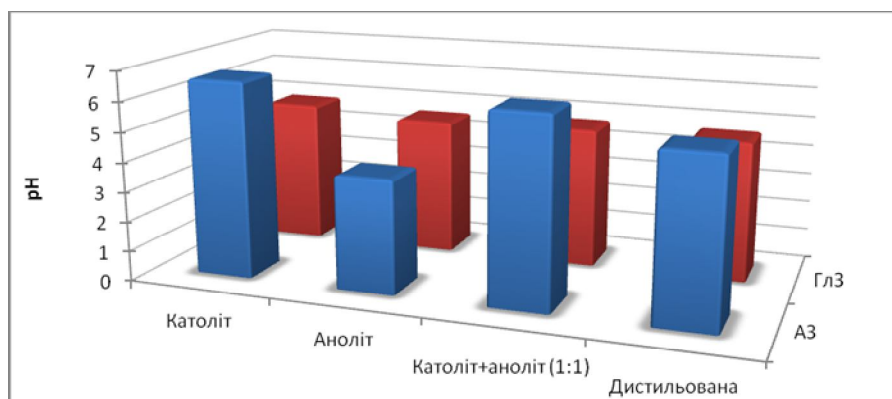


Рис. 1. Значення pH розчинів субстратів

Джерело: за результатами експериментальних досліджень

страту знижує цей показник на 21 % у порівнянні з контролем (рис. 2).

Іншу закономірність спостерігали при вивченні впливу компонентів субстрату на глюкоамілазну активність Diazyme SSF. Усі зразки води сприяли підвищенню активності ензиму в діапазоні 14–44 %. Максимальну глюкоамілазну активність проявляли аноліт та суміш (католіт + аноліт) (рис. 3).

Це, можливо, пояснюється тим, що грибні глюкоамілази активніші за кислих значень рН, і їхня стабільність залежить від незначних змін у просторовій структурі ензиму, викликаних перерозподілом зарядів на його поверхні за рахунок хімічного складу аноліту. Це узгоджується з даними [1] щодо водневих зв'язків або іонізованих молекул води, здатних стабілізувати каталітичний домен грибної глюкоамілази.

Надалі вивчали вплив зразків води на альфа-амілазну та глюкоамілазну активності Amylex 4T та

Diazyme SSF. При цьому розчини ензимів готували на основі католіту, аноліту, суміші католіт+аноліт у співвідношенні 1:1 та водопровідної води, значення рН яких наведено на рис. 4. У всіх зразках розчинів ферментів субстрат готували на основі дистильованої води. Для контрольного зразка субстрату та розчини Amylex 4T та Diazyme SSF готували на дистильованій воді.

Результати досліджень свідчать, що альфаамілазна активність є максимальною при використанні католіту для приготування розчину ферментного препарату Amylex 4T і зростає більше, ніж у 2 рази у порівнянні з контролем. Суміш католіт+аноліт сприяє підвищенню активності ензиму на 58,47 % у порівнянні з контролем (рис. 5). Очевидно, що не лише рН розчинів, оскільки в католіті він знаходиться за межами дії даного ферменту, але й хімічний склад зразків води сприяє підвищенню альфа-амілазної активності.

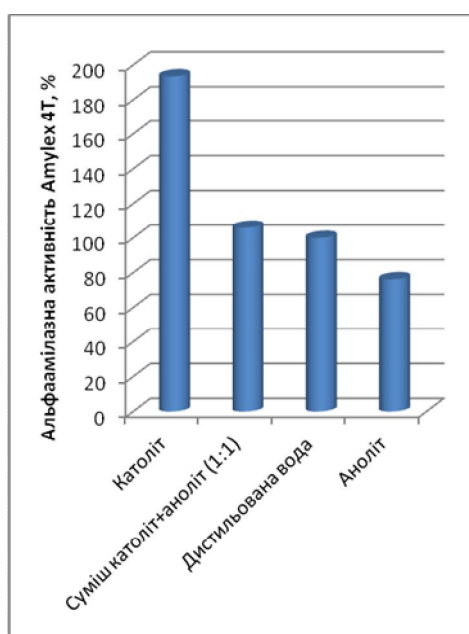


Рис. 2. Альфаамілазна активність Amylex 4T

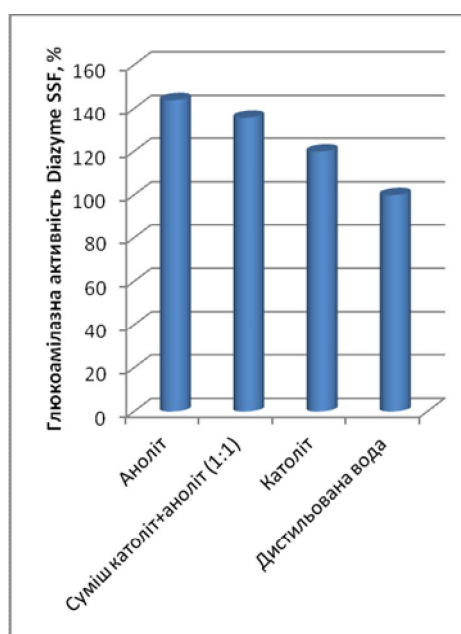


Рис. 3. Глюкоамілазна активність Diazyme SSF

Джерело: за результатами експериментальних досліджень

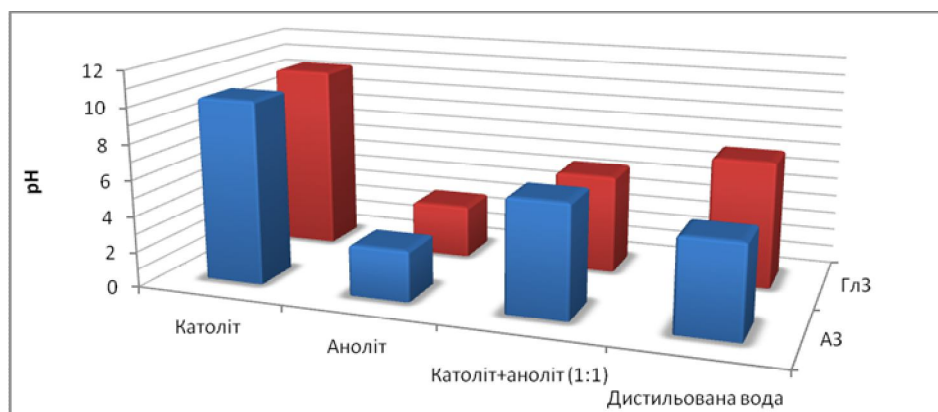


Рис. 4. Значення рН розчинів ензимів Amylex 4T та Diazyme SSF

Джерело: за результатами експериментальних досліджень

У зразку з водопровідної водою альфаамілазна активність знижується на 20,70 %, а з анолітом – фермент інактивується (рис. 5). Це пояснюється низьким значенням рН розчину аноліту, що виходить за межі каталітичної дії Amylex 4T.

Цікаві результати одержано при дослідженні глюкоамілазної активності Diazyme SSF. В усіх варіантах спостерігається її підвищення, проте закономірність у зразках по відношенню до субстрату, приготованого на досліджуваних водах, відрізняється. Так, найактивнішим виявився фермент у католіті та суміші католіту й аноліту, що веде до підвищення його активності у порівнянні з контролем на 65,72 % та 70 %, 26 % відповідно (рис. 6).

Очевидно, вплив хімічного складу католіту є домінуючим відносно впливу концентрації водневих іонів, оскільки дія глюкоамілази знаходиться при рН нижчих від нейтрального, що підтверджує специфічні властивості електрохімічно активованої води [9]. Аноліт підвищує активність Diazyme SSF на 35,69 %, забезпечуючи відповідне для дії ензиму рН розчину (рис. 6).

4. Висновки

Досліджено альфаамілазну та глюкоамілазну активності амілолітичних ензимів Amylex 4T та Diazyme SSF відповідно, у присутності електрохімічно активованої води. Ці ферментні препарати мають широке використання у багатьох галузях промисловості, чим зумовлено їх вибір.

Встановлено, що католіт сприяє підвищенню альфаамілазної активності Amylex 4T у процесі гідролізу крохмалю у 1,9 – 2,2 рази, а суміш католіту й аноліту у співвідношенні 1:1 на 58,47% при приготуванні на ньому ферменту і на 5,97 % при додаванні суміші до субстрату.

Виявлено, що електрохімічно активована вода, тобто католіт, аноліт та їх суміш (1:1) підвищує глюкоамілазну активність Diazyme SSF.

Запропоновано використання електрохімічно активованої води у ферментативних процесах гідролізу полі- та олігосахаридів, а також крохмалевмісних субстратів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Борзова, Н. В. Глюкоамілаза мікроорганізмів. Біосинтез, властивості, механізм дії та практичне застосування / Н. В. Борзова, О. В. Гудзенко, Л. Д. Варбанець // Біотехнологія. – 2009. – Т. 2, №1. – С.9-23.
2. Галич, И. П. Амилазы микроорганизмов / И. П. Галич – К.: Наук. думка, 1987. – 192 с.
3. Гончарук В. В. Изменение свойств воды под влиянием электрохимической обработки / В. В. Гончарук, В. В. Маляренко // Химия и технология воды. – 2001. – Т.23, №4. – С. 345-353.
4. Карпугіна, М. Фізичні методи обробки сировини / М. Карпугіна, В. Марінченко, В. Носенко // Харчова і переробна промисловість. – 2006. – №6. – С. 24-25.
5. Ковалева, Т. А. Влияние синтетических и природных ингибиторов на физико-химические свойства глюкоамилазы / Т. А. Ковалева и др. // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. – Т. 9. Вып. 4

6. Кубрак, О. І. Скринінг штамів *Bacillus sp.* – продуцентів термостабільної α -амілази / О. І. Кубрак, В. І. Лушак // Мікробіологічний журнал. – 2007. – Т. 69. – № 5. – С.26-34.

7. Піх, З. Г. Вплив ультразвукової кавітації на приготування та зброджування сусла зі спельти / З. Г. Піх, Л. Я. Паляниця, Н. І. Березовська, Р. Б. Косів, О. В. Швабюк // Наукові праці НУХТ. – 2011. – № 37, 38. – С. 214-216.

8. Препарати ферментні для спиртового виробництва. Методи визначення амілолітичної активності: СОУ 15.9–37–241:2005 // Стандарт організації Мінагрополітики України. Украгрозстандартсертифікація. – 2006. – 26 с.

9. Прилуцкий В. И. Электрохимически активированная вода: аномальные свойства, механизм биологического действия / В. И. Прилуцкий, В. М. Бахир – М. : ВНИИМТ, 1997. – 244 с.

10. Синецын А. П. Микробные биокатализаторы и перспективы развития ферментных технологий в перерабатывающих отраслях АПК. / Синецын А. П., Марков А. В., Семенова М. В.– М., 2004. – С. 95.

11. Шиян, П. Л. Вплив мультиензимного комплексу ферментних препаратів на біоконверсію біополімерів у спиртовому виробництві / П. Л. Шиян, Т. О. Мудрак, П. М. Бойко, Г. В.Єрмакова // Режим доступу: <http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/198>. – 2012.

12. Шиян, П. Л. Іноваційні технології спиртової промисловості. Теорія і практика / П. Л. Шиян, В. В. Сосницький, С. Т. Олійничук. – К.: Вид. дім. «Асканія», 2009. – 424 с.

13. Шиян, П. Л. Стабілізація амілолітичної активності ферментних препаратів під час термоферментативного оброблення зернових замісів / П. Л. Шиян, Д. О. Ткаченко, Л. В. Ткаченко // Обладнання та технології харчових виробництв: тематичний збірник наукових праць ДонНУЕТ. – 2012. – Вип. 28. – 77-81 с.

14. Crab, W. Enzymes involved in the processing of starch to sugars / W. Crab, C. Mitchinson // Trends Biotechnol. – 1997. – N15. – P. 349-352.

15. Fukuda, T. Improvement in enzymatic desizing of starched cotton cloth using yeast codisplaying glucoamylase and cellulosebinding domain / T. Fukuda, M. Kato:Murai, K. Kuroda et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – V. 77, N6. – P. 1225-1232.

16. Product description – PD 227617–3.1 EN Режим доступу: http://mags.datagraf.dk/epub/files/brewing%20e-guide/amylex_4t.pdf

17. Product description – PD 215918–5.6 EN Режим доступу: http://mags.datagraf.dk/epub/files/brewing%20e-guide/diazyme_fa.pdf

18. Shigechi, H. Direct production of ethanol from raw com starch via fermentation by use of a novel surface engineered yeast strain codisplaying glycoamylase and α -amylase / H. Shigechi, J. Koh, Y. Fujita et al. // Appl. And Environ Microbiol. – 2004. – V. 70, N8. – P. 5037-5040.

19. Van der Maarel, M. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family / M. Van der Maarel, B. Van der Veen, H. Uiterhaag et al. // Ibid. – 2002. – V. 94. – P. 137-155.