

# Stabilita technického prípravku $\alpha$ - amylázy z *Bacillus subtilis* a možnosti jej zvýšenia

663.15 663.13

Ing. DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ, CSc., Doc. Ing. JOZEF AUGUSTÍN, CSc., Chemickotechnologická fakulta SVŠT, 812 37 Bratislava

**Kľúčové slová:** *stabilita amylolytických enzýmov, bakteriálna  $\alpha$ -amyláza, stabilizácia enzýmov, Bacillus subtilis, inaktivácia*

## ÚVOD

Enzymológia zaznamenala v poslednom čase veľa úspechov. Aplikácia enzýmov mení od základu celý rad technológií, ktoré sa tým stávajú progresívnejšími a ekonomickejšími. Efektívnym zdrojom enzýmov sú produkčné mikroorganizmy, ktoré za optimálnych podmienok fermentácie na vhodnom médiu produkujú enzýmy s vysokou koncentráciou. Enzýmy sa z prostredia kulti-

vácie izolujú s dobrým výťažkom vo forme aktívneho preparátu v tekutom, resp. práškovom stave [1]. Strata enzýmovej aktivity počas skladovania predstavuje v súčasnej dobe značný technologický a ekonomický problém [2]. Je preto pochopiteľné, že sa stále hľadajú vhodné spôsoby na zvýšenie stability enzýmových prípravkov. Pri bežne vyrábaných enzýmových prípravkoch sa zníženie straty aktivity v priebehu skladovania dosahuje prídavkom vhodných stabilizátorov, alebo ak



to ekonomické faktory dovoľujú, čiastočnou purifikáciou prípravku.

Cieľom našej práce bolo získať ďalšie poznatky o možnosti stabilizácie technického prípravku bakteriálnej  $\alpha$ -amylázy, dodávanej vo forme kvapalného zahusteného prípravku.

#### MATERIÁL A METÓDY

V práci sme použili komerčne vyrábané amylázové enzýmové prípravky z výroby enzýmov v n. p. Slovenské škrobárne Dolná Krupá. Producent bol čiastočne odstránený a prípravok koncentrovaný ultrafiltráciou. (Bolamyláza o počiatkovej špecifickej aktivite 1720 jDA.  $g^{-1}$ ). Prípravok bol pred použitím vyčistený centrifugáciou (20 minút pri 3000 g), rozdelený na alikvótné podiely a uchovávaný v zmrazenom stave pri  $-20^{\circ}C$ , pri  $4^{\circ}C$  a  $25^{\circ}C$  [3].

Amylázová aktivita bola stanovená Wohlgemutovou metódou [4], proteínázová aktivita testom PROTEASE UNIVERSAL, n. p. Spofa. Test je vhodný pre stanovenie zásaditej, kyslej i neutrálnej proteínázovej aktivity. Bielkoviny boli stanovené Lowryho metódou [5].

#### VÝSLEDKY A DISKUSIA

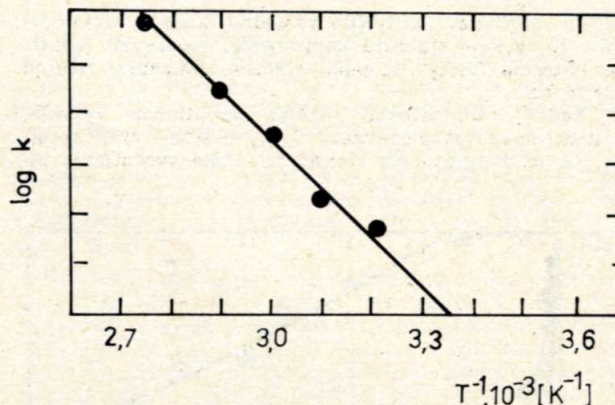
Orientačné pokusy ukázali, že študované enzýmové prípravky podľa deklarovanej aktivity  $\alpha$ -amylázy vykazujú značnú proteínázovú aktivitu (tab. 1), čo je v súlade s literárnymi údajmi o produkčných vlastnostiach kmeňov *Bacillus subtilis* [1]. Predpokladali sme, že jednou z príčin straty amylázovej aktivity je pôsobenie znečisťujúcich proteínáz. Čistočným odstránením suspendovaných pevných častíc odstredením sa znížil obsah proteínu a stúpla špecifická enzýmová aktivita  $\alpha$ -amylázy na gram proteínu. Dialýzou oproti  $10 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ CaCl}_2$  sa odstránilo 60 % látok stanoviteľných s Folinovým činidlom (tento podiel predstavujú aminokyseliny a peptidy pochádzajúce z použitej suroviny a vytvorené v procese kultivácie, spracovania a skladovania prípravku až do analýzy) a špecifická aktivita  $\alpha$ -amylázy stúpla trojnásobne. Naopak, dialýza oproti  $\text{ZnSO}_4$  viedla k úplnej strate aktivity  $\alpha$ -amylázy.

Tab. 1. Hodnoty amylázovej a proteínázovej aktivity, refraktometrickej sušiny a obsahu bielkovín vzoriek retinátov odseparovaného kultivačného média

Vzor- ka	Enzýmová aktivita		Refrakto- metrická sušina [g.100 g $^{-1}$ ]	Obsah bielkovín g.100 ml $^{-1}$
	amylázová [SKB.j.l $^{-1}$ ]	proteínázová [U.l $^{-1}$ ]		
I	250 000	809 000	6	2,2
II	200 000	770 000	5	1,9

#### Vplyv teploty

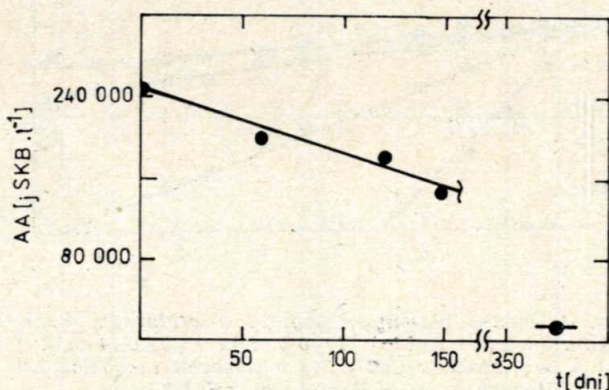
V predbežných pokusoch sme si overili, že rýchlosť inaktívácie v závislosti na teplote sa riadi Arrheniovým vzťahom. Závislosť je uvedená na obr. 1 a experimentálne údaje v tab. 2. Zistili sme, že pri uskladnení pôvodného enzýmového prípravku pri  $4^{\circ}C$  dochádza k strate aktivity rýchlosťou, ktorú možno charakterizovať polčasom (časom potrebným na stratu aktivity rovnajúcu sa 50 % aktivity východze)  $\tau$  rovnému približne 190 dní. Malá rýchlosť inaktívácie pri teplotách do  $20^{\circ}C$  je z hľadiska experimentálneho overovania vplyvu rôznych stabilizačných prípravkov nevýhodná a neumožňuje získať spoľahlivé údaje v krátkom čase, preto sme v tejto práci overovali vplyv stabilizačných činidiel pri teplotách vyšších. Pracovali sme pri teplote  $50^{\circ}C$ , pretože zvolená teplota je ešte v oblasti, kedy nedochádza k inaktívácii  $\alpha$ -amylázy v dôsledku denaturačného pôsobenia teploty a danou technikou je možné ukončiť experiment v priebehu niekoľkých desiatok hodín. Na obr. 2 je uvedený pokles aktivity vzorky retinátu odseparovaného kultivačného média skladovaného pri  $4^{\circ}C$  počas 13 mesiacov uskladnenia. V priebehu 6 mesiacov si



Obr. 1. Závislosť logaritmov rýchlostných konštánt inaktívácie bakteriálnej  $\alpha$ -amylázy z *Bacillus subtilis* na reciprokej hodnote teploty skladovania. (Vid' tab. 2). Regresnou analýzou zistené konštanty priamky:  $\log k = 29,1 - 10 545/T$ .

Tab. 2. Rýchlostné konštanty inaktívácie bakteriálnej  $\alpha$ -amylázy z *Bacillus subtilis* pri rôznych teplotách (vid' obr. 1)

Teplota [ $^{\circ}C$ ]	k [min $^{-1}$ ]	$t_{1/2}$ [h]	log k	1/T [K $^{-1}$ · 10 $^{-3}$ ]
37	0,000051	231	-4,3	3,2
50	0,000283	140	-4,1	3,1
60	0,0037	3,1	-2,4	3,0
70	0,0351	0,3	-1,5	2,9
80	0,4654	0,02	-0,3	2,8
90	1,2220	0,009	0,1	2,75



Obr. 2. Pokles aktivity  $\alpha$ -amylázy v priebehu uskladnenia pri  $4^{\circ}C$ . AA — amylázová aktivita, SKB (Sandsteadt-Kneen-Blish).

prípravok zachoval 70 % počiatkovej enzýmovej aktivity, avšak za ďalších 6 mesiacov skladovania stratil úplne aktivitu. Uskladnením pri  $37^{\circ}C$  enzým už stráca výrazne stabilitu, takže po 6 dňoch zvyšková aktivita predstavuje iba 70 % pôvodnej hodnoty, pri  $50^{\circ}C$  iba približne 50 % pôvodnej hodnoty. Prudký pokles stability nastáva zvýšením teploty na  $60^{\circ}C$  a nad  $60^{\circ}C$  (obr. 3). K úplnej inaktívácii enzýmu pri  $60^{\circ}C$  dochádza prakticky už po 24 hodinách.

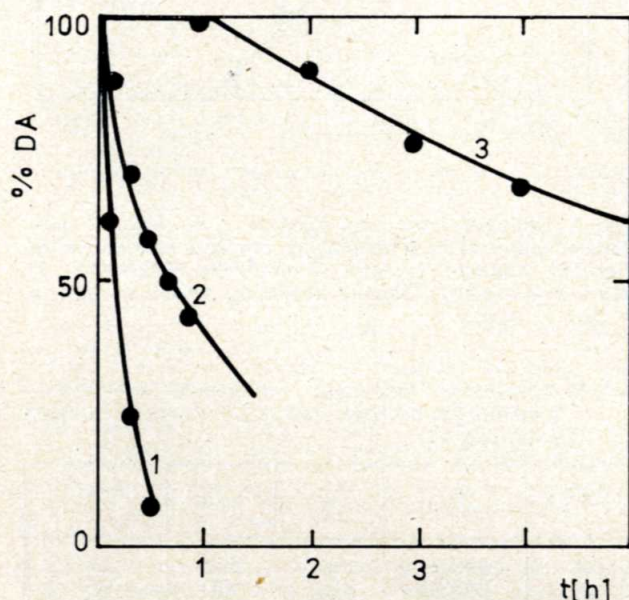
#### Vplyv anorganických solí

Pre zachovanie katalytickej aktivity  $\alpha$ -amylázy z *Bacillus subtilis* je potrebná prítomnosť  $\text{Ca}^{2+}$  iónov. Sledovali sme preto vplyv prídavku  $\text{CaCl}_2$  v koncentráciách 0,004 až  $1 \text{ mol.l}^{-1}$  na stabilitu roztoku  $\alpha$ -amylázy v enzýmovom prípravku počas inkubácie pri  $50^{\circ}C$ . Prídavok

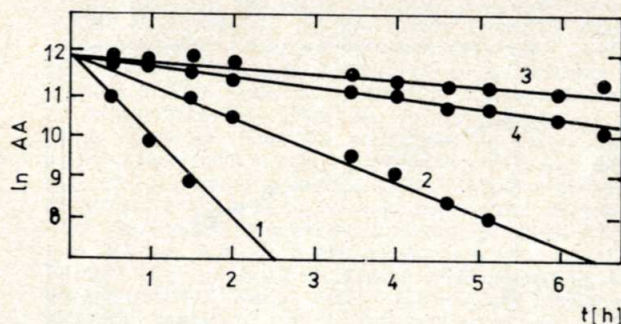


malých množstiev  $\text{CaCl}_2$  (do výslednej koncentrácie  $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ ) zvyšuje stabilitu enzýmového prípravku. Vyššie koncentrácie  $\text{CaCl}_2$  naopak, stabilitu enzýmu znižujú (obr. 4, tab. 3).

Z hodnôt rýchlostných konštánt inaktivácie vyplýva, že kontrolovaným prídavkom  $\text{CaCl}_2$  možno zvýšiť stabilitu až na dvojnásobok. Najjednoduchšie vysvetlenie to-



Obr. 3. Termostabilita dialyzovanej  $\alpha$ -amylázy pri teplotách 60, 70 a  $80^\circ\text{C}$ , DA-dextrinačná aktivita.



Obr. 4. Pokles aktivity  $\alpha$ -amylázy s prídavkom  $\text{CaCl}_2$  o koncentracii  $1 \text{ mol.l}^{-1}$  (1),  $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$  (2),  $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$  (3) a bez prídavku  $\text{CaCl}_2$  (4) v priebehu inkubácie pri  $50^\circ\text{C}$ . Stanovené pri riedení 1:20, pH 6,3.

Tab. 3. Zmena stability enzýmového prípravku  $\alpha$ -amylázy po prídavku látok s predpokladaným stabilizačným účinkom a hodnota polčasu straty aktivity pri inkubácii enzýmu pri  $50^\circ\text{C}$

Stabilizátor	Koncentrácia [g.l <sup>-1</sup> ]	Polčas straty aktivity [h]	Stabilita [%]
škrob	0	69,3	100
	200	346,5	500
etanol	0	54,3	100
	250	22,7	41,8
	500	6,3	11,6
$\text{CaCl}_2$	0	73,0	100
	4,5	121,6	168,6
	22	22,4	30,7
	111	7,9	10,8
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	0	132	100
	285	1 001	756,3

hoto javu je, že v prípravku sa nenachádza dostatok  $\text{Ca}^{2+}$  iónov potrebných pre uchovanie aktivity enzýmu, a to buď v dôsledku straty  $\text{Ca}^{2+}$  iónov v priebehu technologického spracovania (ultrafiltráciou), alebo v dôsledku viazania  $\text{Ca}^{2+}$  iónov ligandom, ktorý poskytuje pevnejšiu väzbu s  $\text{Ca}^{2+}$  iónmi ako makromolekula  $\alpha$ -amylázy.

Ďalej sme overili vplyv prídavku  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  na stabilitu  $\alpha$ -amylázy v roztoku v priebehu uskladnenia (tab. 3).  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  v koncentracii  $285 \text{ g.l}^{-1}$  zvýši stabilitu prípravku až 7násobne.

#### Vplyv organických rozpúšťadiel

Enzýmová aktivita  $\alpha$ -amylázy v prítomnosti etanolu o koncentracii 250 až  $500 \text{ g.l}^{-1}$  bez chladenia má za následok rapidný pokles stability enzýmovej aktivity (tab. 3).

#### Stabilizácia prídavkom nerozpustného substrátu

Imobilizácia enzýmov viazaním na nerozpustný nosič predstavuje jednu z metód zvýšenia stability enzýmového prípravku. Vo všeobecnosti enzýmy majú zvýšenú afinitu k vlastnému substrátu. Amylázy sa v prvej fáze interakcie adsorbujú na povrch nerozpustných zŕn škrobu, dá sa preto predpokladať, že takto adsorbovaný enzým bude menej atakovaný činidlami, ktoré vyvolávajú stratu amylázovej aktivity, teda bude rezistentnejší aj proti pôsobeniu proteínáz. Prídavkom nerozpustného škrobu v množstve  $200 \text{ g.l}^{-1}$  enzýmového prípravku sa znížila rýchlosť inaktivácie  $\alpha$ -amylázy 5násobne (tab. 3). Prídavkom rozpustného škrobu o tej istej koncentrácii sa stabilita  $\alpha$ -amylázy nezvýšila.

Ukázal sa aj stabilizujúci účinok želatíny, ktorá v koncentrácii  $200 \text{ g.l}^{-1}$  znižuje rýchlosť inaktivácie  $\alpha$ -amylázy v porovnaní s kontrolou 3násobne.

#### ZÁVER

Stabilitu technického kvapalného prípravku  $\alpha$ -amylázy z *Bacillus subtilis* v priebehu uskladnenia možno zvýšiť prídavkom  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  v množstve  $285 \text{ g.l}^{-1}$  sedemnásobne. Prídavok  $\text{CaCl}_2$  v množstve  $111 \text{ g.l}^{-1}$  znižuje stabilitu desaťnásobne, v množstve  $4,44 \text{ g.l}^{-1}$  zvyšuje stabilitu 1,6násobne. Prídavok nerozpustného škrobu v množstve  $200 \text{ g.l}^{-1}$  zvyšuje stabilitu päťnásobne. Dialýzou oproti  $\text{CaCl}_2$  aktivita  $\alpha$ -amylázy stúpla trojnásobne.

#### POĎAKOVANIE

Dovoľujeme si touto formou poďakovať Ing. E. Firákovej a Ing. I. Soldánovej, CSc. za poskytnutie testovacích vzoriek a cenné rady počas vypracovania tejto práce.

Lektoroval dr. V. Jirků, CSc.

#### Literatúra

- [1] SOLDÁNOVÁ, I.: Optimalizácia výroby bakteriálnej  $\alpha$ -amylázy. (Záverečná správa). Bratislava, VÚ LIKO 1983.
- [2] MARKOVIČ, J.: Čiastková správa štátnej výskumnej úlohy S 11-529-058: „Príčiny inaktivácie amylázy“, CHÚ SAV, 1982.
- [3] MOKÁNOVÁ, G.: Stabilizácia aktivity kvapalného koncentrátnu  $\alpha$ -amylázy z *Bacillus subtilis*. (Diplomová práca). Bratislava 1984, ČHTF SVST.
- [4] BARFOED, H.: Enzymatische Methoden zur Stärkeverflüssigung. Die Stärke 19, 1967, p. 291.
- [5] LOWRY, O. H., RESEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, A. J.: J. Biol. Chem. 193, 1951, p. 265-275.

Smogrovičová, D., Augustín, J.: Stabilita technického prípravku  $\alpha$ -amylázy z *Bacillus subtilis* a možnosti jej zvýšenia. Kvas. prům. 32, 1986, č. 9, s. 212-215.

Práca pojednáva o príčinách straty enzýmovej stability roztokov enzýmových prípravkov  $\alpha$ -amylázy z *Bacillus subtilis*, zahustených ultrafiltráciou. Hľadajú sa spôsoby stabilizácie týchto technických prípravkov v procese skladovania jednou z príčin straty enzýmovej aktivity je proteínázová aktivita uvedených prípravkov. Prídavkom anorganických solí, nerozpustného škrobu a roztoku bielkoviny sa podarilo znížiť výsledné inaktivácie 3 až 7násobne.



Шмогровичова, Д., Аугустин, Я.: Стабильность технической  $\alpha$ -амилазы из *Bacillus subtilis* и возможности ее повышения. Квас. прум. 32, 1986, № 9, стр. 212—215.

Исследовались причины понижения ферментной активности растворов технической  $\alpha$ -амилазы образованной *Bacillus subtilis*. Растворы были концентрированы ультрафилтрацией. Были исследованы средства стабилизации технических ферментов в процессе хранения.

Одной из причин потери ферментной активности является присутствие протеолитических ферментов. Найдено, что прибавление неорганических солей нерастворимого крахмала и растворов белка замедлило процесс инактивации фермента в 3—7 раз.

Šmogrovičová, D., Augustín, J.: Stability of Technically pure  $\alpha$ -amylase of *Bacillus subtilis* and the Possibility of its Increasing. Kvas. prům. 32, 1986, No. 9, pp. 212—215.

The article deals with the causes of loss of enzymatic stability of  $\alpha$ -amylase solution of *Bacillus subtilis* concentrated by ultrafiltration. The methods of stabi-

lization of technically pure enzyme solutions in the process of storage are investigated. One of the causes of loss of enzymatic activity is proteinase activity of enzymatic preparations. The addition of anorganic salts, insoluble starch or protein solution reduces the inactivation from three to seven times.

Šmogrovičová, D. - Augustín, J.: Stabilität des technischen  $\alpha$ -Amylase-Präparats aus *Bacillus subtilis* und Möglichkeiten ihrer Erhöhung. Kvas. prům. 32, 1986, Nr. 9, 212—215.

Die Arbeit behandelt die Gründe des Verlustes der Enzymstabilität von Lösungen der enzymatischen Präparate der  $\alpha$ -Amylase produziert durch *Bacillus subtilis*, die durch die Ultrafiltration verdichtet wurden. Es wurden Wege der Stabilisierung dieser technischen Präparate bei ihnen Lagerung gesucht. Einer der Gründe des Verlustes der Enzymaktivität ist die Proteinaseaktivität der obengenannten Präparate. Durch Salzzugabe, Zugabe von unlöslicher Stärke und einer Eiweißlösung ist es gelungen die Inaktivierungen drei-bis siebenfach zu erniedrigen.