

Определение активности амилолитических ферментов по гидролизу субстрата, иммобилизованного в полиакриламидном геле

В. О. Максимова*, В. О. Цветков, И. А. Шпирная, Р. И. Ибрагимов

Башкирский государственный университет

Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

*Email: vilenka312@yandex.ru

В ходе работы была определена амилолитическая активность препаратов амилаз с использованием субстрата, иммобилизованного в полиакриламидном геле. В работе использовали препараты амилаз *Bacillus subtilis*, *Leptinotarsa decemlineata* Say и слюны человека. Также были проведены опыты по определению влияния pH раствора и концентрации соли на окрашивание геля. Изображения полученных гелей после окрашивания анализировали с помощью компьютерной программы, позволяющей определять среднее значение цвета отдельных участков на изображении.

Ключевые слова: амилолитические ферменты, определение активности.

Амилазы – ферменты класса гидролаз, которые катализируют гидролитическое расщепление полисахаридов (крахмала, гликогена) и продуктов их неполного расщепления (олигосахаридов и декстринов) [1]. Крахмал – полисахарид, построенный из большого числа остатков α -глюкозы. Состоит из двух фракций: амилозы, которая представляет собой линейный полимер глюкозы, и амилопектина, имеющий ответвления от основной цепи молекулы. Расщепление крахмала осуществляется ферментами четырех типов: экзо- и эндоамилазы, которые воздействуют на 1,4- α -гликозидные связи крахмала, ферменты, которые отщепляют ответвления амилопектина за счет гидролиза 1,6- α -гликозидных связей, и циклодекстрингликотрансферазы, которые расщепляют молекулу крахмала за счет гидролиза циклических сахаров [2].

В группу амилолитических ферментов, которые гидролизуют крахмал, входят α -амилаза, β -амилаза, глюкоамилаза, которые наиболее хорошо изучены на сегодняшний день, помимо них, также входят α -глюкозидаза, изоамилаза и пуллуланаза. По структуре молекул и функциональным свойствам эти ферменты отличаются друг от друга [3].

Амилазы, которые выделены из грибов, устойчивы к действию кислот, а бактериальные ферменты более термостабильны. В промышленности чаще используют бактериальные амилазы, продуцируемые бактериями рода *Bacillus*, но также и из грибов рода *Aspergillus*. Для получения термостабильных α -амилаз используют штаммы *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* и *B. amyloliquefaciens* [4–7]. Амилазы растений и животных стабильны при физиологических значениях pH и температуре не выше 40–

50°C. Амилолитическая активность характерна для большинства представителей таксономических групп грибов и в основном эти ферменты представлены конститутивными белками, в том числе и у древоразрушающих грибов [8].

Для получения растворов, обладающих ферментативной активностью, использовали препараты амилаз *Bacillus subtilis*, *Leptinotarsa decemlineata* Say и слюны человека. Для определения амилолитической активности ферментов использовали полиакриламидный гель (6%) с иммобилизованным крахмалом (1%). Для нанесения ферментативного раствора на гель применяли стандартный иммунологический планшет. В качестве рабочего буфера служил фосфатный буфер (0.2М, рН 6; 12% 0.2М Na₂HPO₄ и 88% 0.2М NaH₂PO₄). Изображения гелей без графической обработки анализировали с помощью компьютерной программы для определения среднего значения цвета точек на выделенном участке изображения, написанной в нашей лаборатории. Определяли интенсивность окраски гидролизованных участков геля с повторностью не менее 3 раз. Полученные данные подвергали статистической обработке.

Для изучения возможности количественного определения активности протеаз готовили растворы с различным содержанием коммерческого препарата амилазы *Bacillus subtilis*, препаратов амилаз *Leptinotarsa decemlineata* Say и слюны человека. Изображения гелей без графической обработки и с цветовой коррекцией анализировали с использованием компьютерной программы для определения среднего значения цвета точек на выделенном участке изображения. Результаты обработки полученных данных показаны на рисунках 1–3.

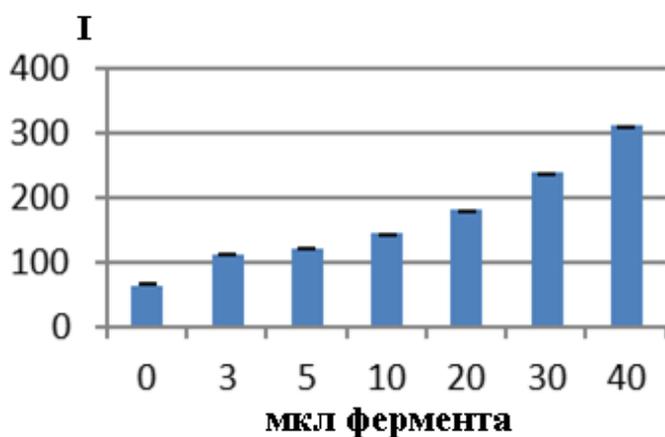


Рис. 1. Определение активности амилазы *Bacillus subtilis*. По горизонтальной оси – количество микролитров фермента, по вертикальной оси – среднее значение цвета участка изображения.

Анализ результатов (рис. 1–3) показал, наличие во всех трех вариантах опыта прямой зависимости интенсивности окрашивания от количества фермента.

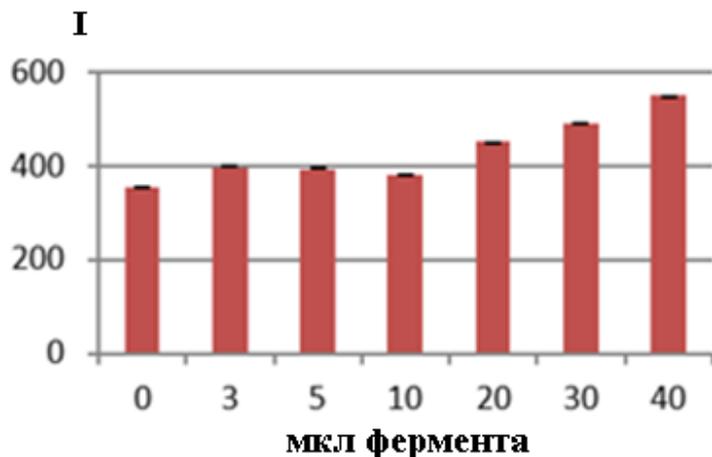


Рис. 2. Определение активности амилазы *Leptinotarsa decemlineata*. По горизонтальной оси – количество микролитров фермента, по вертикальной оси – среднее значение цвета участка изображения.

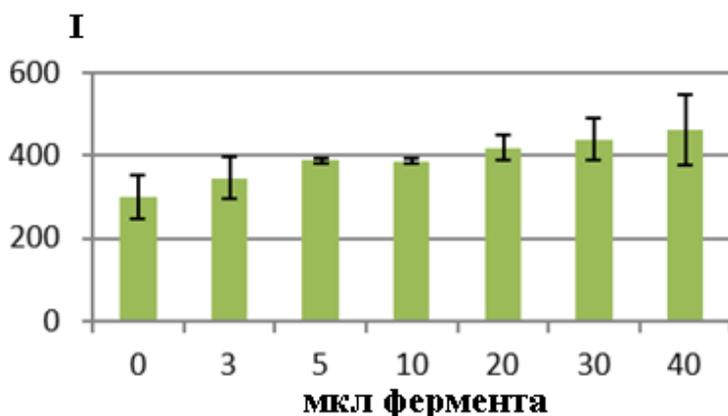


Рис. 3. Определение активности амилазы слюнной жидкости человека. По горизонтальной оси – количество микролитров фермента, по вертикальной оси – среднее значение цвета участка изображения.

Для исследования влияния pH среды и концентрации солей готовили растворы с различными значениями pH и концентрациями NaCl, выдерживали на геле в течение 20 минут. После инкубации пластины обрабатывали раствором Люголя (0.3%-ный раствор кристаллического йода в 3%-ном растворе йодида калия). Изображения полученных гелей после окрашивания анализировали с помощью компьютерной программы, которая позволяет определять среднее значение цвета отдельных участков.

Анализ результатов (рис. 4, 5) показал, что оба исследованных параметра оказывают значимое влияние на регистрируемые значения яркости и должны быть учтены при проведении измерений.

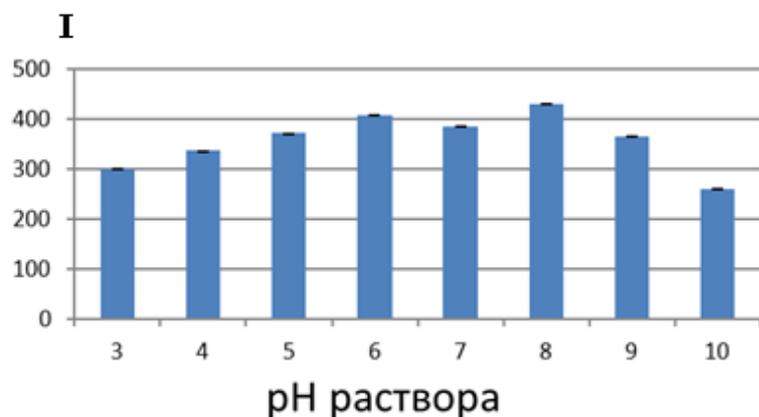


Рис. 4. Результаты анализа изображений гелей после воздействия растворов с различным pH. По горизонтальной оси – pH раствора, по вертикальной оси – среднее значение цвета участка изображения.

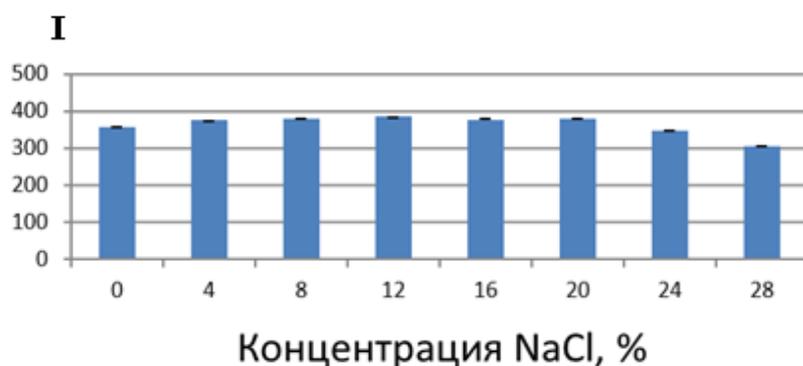


Рис. 5. Результаты анализа изображений гелей после воздействия растворов с различной концентрацией NaCl. По горизонтальной оси – концентрация NaCl, по вертикальной оси – среднее значение цвета участка изображения.

Литература

1. Энциклопедический словарь медицинских терминов / Под ред. Петровский Б. В.. М.: Советская энциклопедия, 1982–1984. 1424 с.
2. Horvathova V, Janecek S, Sturdik E. Amylolytic enzymes: their specificities, origins and properties // *Biologia*, Bratislava, 2000. V. 55. №6. P. 605–615.
3. Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities // *Biochem. J*, 1991. V. 280. P. 309–316.
4. Калимкулова М. Получение рекомбинантной α -амилазы AMY1UA7 из *Bacillus subtilis* в клетках *Escherichia coli* / Калимкулова М., Кирибаева А., Мухамедьяров Д., Куламетов Ж., Ахметоллаев И., Силаев Д., Хасенов Б.// *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. Астана: Респ. гос. предприятие на праве хоз-го ведения «Национальный центр биотехнологии» комитета науки мин. обр. и науки респ. Казахстан, 2015. №4. С. 57–65

5. Hagihara H., Igarashi K., Hayashi Y., Endo K., Ikawa-Kitayama K., Ozaki K., Kawai S., Ito S. Novel alpha-amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38 // *Appl Environ Microbiol*, 2001. V.67. №4. P. 1744–1750.
6. Mozhaev V. V. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization // *Trends Biotechnol*, 1993. V.11. №3. P. 88–95.
7. Schallmey M., Singh A., Ward O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production // *Can J Microbiol*, 2004. V. 50. №1. P. 1–17.
8. Семенкова И. Г. Фитопатология. Древоразрушающие грибы, гнили и патологические окраски древесины (определятельные таблицы): учебное пособие. М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2008. 72 с.

Статья рекомендована к печати кафедрой биохимии и биотехнологии Башкирского Государственного университета (д-р. биол. наук, проф. Р. Г. Фархутдинов)

Determining of the activity of amylolytic enzymes using substrate immobilized in polyacrylamide gel

V. O. Maksutova*, V. O. Tsvetkov, I. A. Shpirnaya, R. I. Ibragimov

Bashkir State University

32 Zaki Validi Street, 450076 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

**Email: vilenka312@yandex.ru*

In the work, the amylolytic activity of amylase preparations was determined using a substrate immobilized in a polyacrylamide gel. The preparation used amylases of *Bacillus subtilis*, *Leptinotarsa decemlineata* Say and human saliva. Also, the experiments were conducted to determine the effect of the pH of the solution and the concentration of the salt on the gel. The images of the gels obtained after staining were analyzed using a computer program to determine the average color value of individual areas in the image.

Keywords: amylolytic enzymes, activity determination.