

К.В. Авдіюк¹, Л.Д. Варбанець¹, В.О. Іваниця²

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ДСП, Д03680, Україна, тел.:+38(044) 526 23 39,
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

²Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ACHROMOBACTER SP. 7A – ПРОДУЦЕНТА α -АМІЛАЗИ

Мета. Оптимізувати умови культивування продуцента α -амілази *Achromobacter sp. 7a* для підвищення рівня її біосинтезу. **Методи.** При вивченні впливу різних джерел карбону і нітрогену на біосинтез α -амілази крохмаль і натрій нітрат у базовому поживному середовищі замінювали на різноманітні вуглеводи і джерела нітрогену у кількості, еквівалентній до загального вмісту карбону (44,4%) і нітрогену (16,5%) у базовому середовищі. Активність α -амілази визначали йодометричним методом, вміст білка – методом Lowry et al. Для виявлення значущих елементів мінерального живлення базового середовища проводили відсіювальний експеримент. Визначення оптимальних концентрацій джерел карбону і нітрогену у поживному середовищі проводили шляхом двофакторного експерименту на чотирьох рівнях. **Результати.** Встановлено, що найвищий рівень синтезу фермента спостерігається на 3 добу глибинного культивування. Показано, що суміш солоду з крохмалем у співвідношенні 1:9 і натрій нітрат є оптимальними джерелами карбону і нітрогену, відповідно, для максимального біосинтезу фермента. Визначено оптимальні параметри біосинтезу α -амілази: температура 28 °С, вихідне значення рН середовища 6,0, об'єм поживного середовища 100 мл, кількість посівного матеріалу 15% та інтенсивність перемішування 210 об/хв. **Висновки.** За результатами двофакторного експерименту і підбору оптимальних умов культивування продукція α -амілази *Achromobacter sp. 7a* була підвищена у 4 рази.

Ключові слова: α -амілаза, *Achromobacter sp.*, оптимізація, двофакторний експеримент.

α -Амілази – ферменти, що належать до класу гідролаз, підкласу глікозидаз, які каталізують гідроліз внутрішніх α -D-1,4-глікозидних зв'язків у крохмалі і споріднених йому сполуках [9]. Вони складають одну з найважливіших груп промислових ферментів, які широко застосовуються у харчовій, пивовареній, спиртовій, паперовій і текстильній промисловостях, а також на одній із стадій виготовлення біопалива [11]. Останніми роками межі використання α -амілаз поширилися в клінічну, медичну і аналітичну хімію [9].

Джерелами більшості α -амілаз, які випускають у промислових масштабах, є мікроорганізми, що зумовлено низкою переваг, якими володіють мікробні ферменти порівняно з ензимами рослинного чи тваринного походження, а



сама висока активність та стабільність, здатність до позаклітинного синтезу, широка субстратна специфічність, а також наявність унікальних властивостей (кислото-, алкало-, термостійкість) [2]. Однак для отримання високого виходу ферменту важливе значення має не лише вибір продуценту, а і підбір оптимальних умов культивування. Тому метою роботи була оптимізація умов культивування *Achromobacter* sp. 7a для інтенсифікації синтезу α -амілази.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження була культура *Achromobacter* sp. 7a з колекції морських культур Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова, яка виділена з Чорного моря поблизу острова Зміїний та ідентифікована у Київському національному університеті імені Тараса Шевченка на кафедрі мікробіології та загальної імунології Зеленою П.П. і Шепелевич В.В.

Культивування *Achromobacter* sp. 7a в глибинних умовах на базовому середовищі Чапека (г/л): NaNO_3 – 2,0; KH_2PO_4 – 1,0; KCl – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,015; нерозчинний картопляний крохмаль – 20,0; H_2O – до 1,0 л; рН 6,0, в 0,75 л колбах Ерленмейера зі 100 мл поживного середовища при інтенсивності перемішування 220 об/хв та за температури 28 °С протягом 3 діб. У колби вносили 10%-ий інокулюм (об'єм/об'єм), отриманий шляхом вирощування продуценту на вищевказаному середовищі протягом однієї доби.

Біомасу відділяли центрифугуванням при 5000 g, 30 хв. У супернатанті культуральної рідини (СКР) визначали вміст білка і α -амілазну активність.

Активність α -амілази визначали йодометричним методом відповідно ГОСТу 20264.4-89 [3], вміст білка – методом Lowry et al [3]. Питому активність виражали в перерахунку на 1 мг білка (од/мг білка).

При вивченні впливу різних джерел карбонового живлення на біосинтез α -амілази крохмаль у базовому поживному середовищі замінювали на різноманітні моноцукриди – пентози: ксилозу, арабінозу; гексози – глюкозу, галактозу, манозу, рамнозу; дицукриди: лактозу, мальтозу, цукрозу; трицукрид: рафінозу; цукроспирти: маніт та інозит; поліцукриди: кукурудзяний, пшеничний і рисовий крохмаль, а також соєве борошно у кількості, еквівалентній до загального вмісту карбону у базовому середовищі (44,4%).

Для визначення оптимального джерела нітрогену натрій нітрат вилучали з базового середовища, замінюючи його на амоній хлорид, амоній сульфат, амоній нітрат, дріжджовий автолізат, пептон, сечовину і соєве борошно у кількості, еквівалентній вмісту нітрогену у базовому середовищі (16,5%).

Кількість клітин *Achromobacter* sp. 7a визначали, висіваючи 0,1 мл культуральної рідини (КР) у розведеннях (10^{10} – 10^5) на чашки Петрі з МПА. Посіви інкубували за температури 28 °С протягом 1–2 діб.

При визначенні значущих факторів базового середовища для біосинтезу α -амілази *Achromobacter* sp. 7a дослідження проводили у пробірках об'ємом 50 мл, які містили 10 мл середовища Чапека при інтенсивності перемішування 220 об/хв та за температури 28 °С протягом 3 діб. У пробірки вносили 1%-ий інокулюм (об'єм/об'єм).



Для виявлення значущих елементів мінерального живлення базового середовища проводили відсіновальний експеримент, в якому нижній рівень концентрацій усіх компонентів приймали за нуль (дослідження проводили у великих пробірках об'ємом 50 мл). Значення верхнього рівня дорівнювали концентрації кожного компонента у базовому поживному середовищі. Визначення оптимальних концентрацій джерел карбону і нітрогену в поживному середовищі проводили шляхом двофакторного експерименту на чотирьох рівнях, при цьому фактори поживного середовища позначали як X_n [4].

Усі експерименти проводили у 3-5 повторностях. Аналіз одержаних результатів проводили шляхом їх статистичної обробки, вираховуючи середні арифметичні величини, відхилення від середнього значення не перевищувало 5%.

Результати та їх обговорення

З літературних даних відомо, що максимальний синтез α -амілаз відбувається наприкінці експоненційної, як у *Geobacillus* sp. ПРТН, *Bacillus cohnii* US147 [2], або під час стаціонарної фази росту, як у *Bacillus* sp. YX-1 [8]. У *Achromobacter* sp. 7a максимальний рівень синтезу ферменту спостерігався на 3 добу культивування (рис. 1).

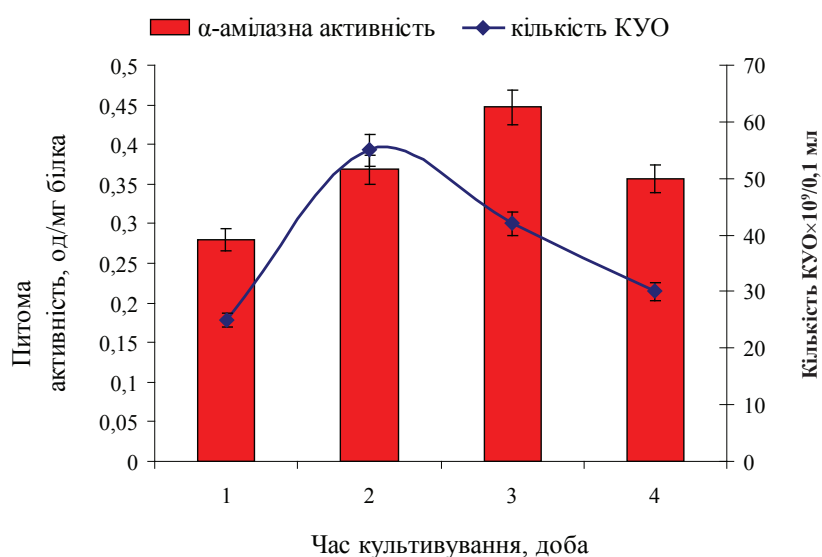


Рис. 1. Динаміка накопичення α -амілази за культивування *Achromobacter* sp. 7a на базовому поживному середовищі

Fig. 1. Dynamics of α -amylase accumulation under the cultivation of *Achromobacter* sp. 7a on the base nutrient medium

Для того, щоб визначити, які саме фактори базового середовища є значущими для біосинтезу α -амілази *Achromobacter* sp. 7a, проводили відсіновальний експеримент, в якому з середовища Чапека по чергово чи попарно вилучали відповідні компоненти (табл. 1).

Таблиця 1

Визначення значущих факторів базового середовища культивування
для біосинтезу α -амілази *Achromobacter* sp. 7a

Table 1

Determination of significant factors of base culture medium for the biosynthesis
of α -amylase by *Achromobacter* sp. 7a

Варіант середовища	NaNO ₃	Крохмаль	KH ₂ PO ₄	KCl	MgSO ₄ ×7H ₂ O	FeSO ₄ ×7H ₂ O	АА, од/мл	Білок, мг/мл	Питома акт-ть, од/мг білка
1	+	+	-	+	+	+	0,450 ± 0,020	0,410 ± 0,020	1,10 ± 0,050
2	+	+	+	-	+	+	0,490 ± 0,021	0,560 ± 0,022	0,875 ± 0,040
3	+	+	+	+	-	+	0,50 ± 0,025	0,560 ± 0,023	0,890 ± 0,043
4	+	+	+	+	+	-	0	0,60 ± 0,025	0
5	-	+	+	+	+	+	0	0,160 ± 0,007	0
6	+	-	+	+	+	+	0	0,070 ± 0,003	0
7	+	+	-	-	+	+	0	0,40 ± 0,020	0
8	+	+	+	-	-	+	0,50 ± 0,026	0,570 ± 0,024	0,880 ± 0,042
9	+	+	+	+	-	-	0,507 ± 0,025	0,660 ± 0,031	0,770 ± 0,035
10	+	+	-	-	-	+	0,124 ± 0,005	0,420 ± 0,021	0,295 ± 0,014
11	+	+	+	-	-	-	0,447 ± 0,022	0,685 ± -0,031	0,652 ± 0,032
12	+	+	-	-	-	-	0,470 ± 0,023	0,520 ± 0,022	0,90 ± 0,045
13	+	+	-	+	-	+	0,072 ± 0,003	0,490 ± 0,024	0,147 ± 0,007
14	+	+	-	+	+	-	0,422 ± 0,021	0,545 ± 0,026	0,774 ± 0,036
15	+	+	+	-	+	-	0	1,20 ± 0,055	0
16	-	-	+	+	+	+	0	0	0
17	+	+	+	+	+	+	0,550 ± 0,022	0,590 ± 0,028	0,930 ± 0,040

Примітка: «+» – наявність відповідного компонента, «-» – відсутність відповідного компонента. Контроль – варіант середовища № 17, яке містить NaNO₃, нерозчинний картопляний крохмаль, KH₂PO₄, KCl, MgSO₄×7H₂O, FeSO₄×7H₂O. АА – активність α -амілази

Note: «+» – presence of the appropriate component, «-» – absence of the appropriate component; data of research was conducted in large test tubes, volume 50 ml. Control – variant of culture medium № 17, containing NaNO₃, insoluble potato starch, KH₂PO₄, KCl, MgSO₄×7H₂O, FeSO₄×7H₂O. AA – activity of α -amylase



За результатами даного експерименту показано, що при вилученні джерел карбону, нітрогену, ферум сульфату, суміші солей калію, суміші солей калій хлориду і ферум сульфату синтез α -амілази (варіанти середовища 4, 5, 6, 7, 15 і 16) був відсутній взагалі. Однак при видаленні окремо калій хлориду (варіант середовища 2) чи фосфату (варіант середовища 1) та магній сульфату варіант середовища (варіант середовища 3) значення питомої α -амілазної активності було майже на рівні контролю (варіант середовища 17), тому склад поживного середовища залишили без змін.

Одним з основних шляхів інтенсифікації біосинтезу ферментів є підбір середовища за джерелами карбону і нітрогену. Джерелом карбону на базовому поживному середовищі виступав крохмаль, який замінювали на різноманітні моноцукриди, дицукриди, трицукрид, цукроспирти, поліцукриди, а також соєве борошно у кількості, еквівалентній до загального вмісту карбону у базовому поживному середовищі (44,4%). За результатами, отриманими різними дослідниками, синтез α -амілаз зазвичай індукується у присутності крохмалю або продуктів його гідролізу [2]. Однак не завжди синтез цих ферментів пов'язаний з наявністю у середовищі крохмалю. Джерелом карбону можуть виступати також інші вуглеводи, наприклад, лактоза [10], мальтоза [2], галактоза [7], трегалоза [2].

При вивченні впливу вуглеводів на синтез α -амілази *Achromobacter sp. 7a* (рис. 2) показано, що α -амілазна активність виявляється лише на середовищі з мальтозою і різними видами крохмалю, використання ж інших джерел карбонового живлення призводить до повного інгібування синтезу ферменту. З даних літератури відомо, що при використанні глюкози, як джерела карбону, синтез більшості α -амілаз, як і у нашому випадку, пригнічується, що пов'язано з явищем катаболітної репресії [2].

Найкраще α -амілазу *Achromobacter sp. 7a* синтезував на середовищі з мальтозою, однак оскільки її собівартість є дуже високою, доцільним було перевірити вплив суміші мальтози і крохмалю на біосинтез α -амілази. Для цього використовували кристалічну мальтозу («Merck», Germany) та солод (суміш ячмінного та рисового), який містить мальтозу («Ning Pagoda Trade Mark», China), що широко застосовується у промисловості Китаю, оскільки є дуже дешевою сировиною, тому її застосування є вигідним з економічної точки зору. Вищезазначені форми мальтози змішували з нерозчинним картопляним крохмалем у співвідношеннях: 1:1, 1:9, 4:6 (рис. 3).

Вивчаючи вплив різних співвідношень мальтози, солоду і нерозчинного картопляного крохмалю на біосинтез α -амілази, було показано, що найбільш ефективним виявилось використання суміші солоду з нерозчинним крохмалем у співвідношенні 1:9, оскільки при цьому значення питомої α -амілазної активності було підвищено на 15% порівняно з контролем. α -Амілаза, виділена з *Bacillus amyloliquefaciens*, також синтезувалася на середовищі, яке містило нерозчинний крохмаль і мальтозу, як джерело карбону [6].

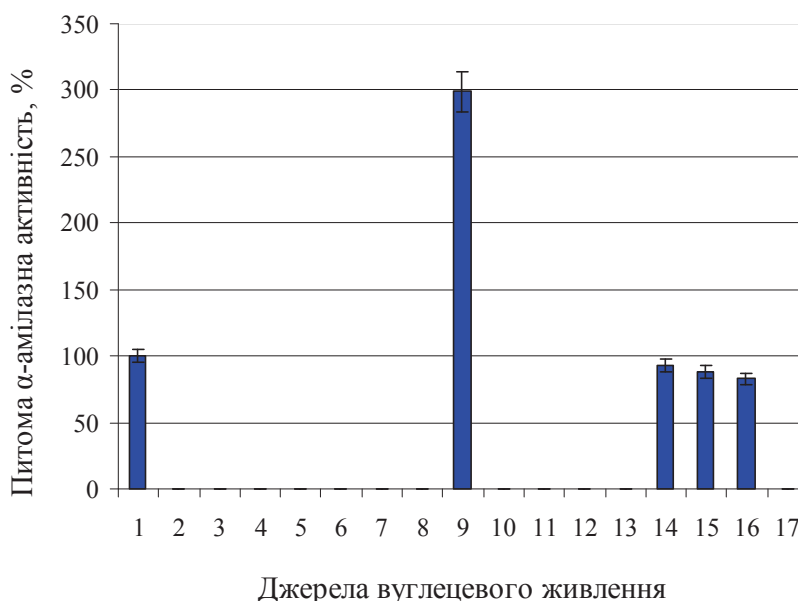


Рис. 2. Вплив різних джерел карбонового живлення на синтез α -амілази *Achromobacter sp. 7a*

Примітка: 1 – контроль, 2 – ксилоза, 3 – арабіноза, 4 – глюкоза, 5 – галактоза, 6 – маноза, 7 – рамноза, 8 – лактоза, 9 – мальтоза, 10 – сахароза, 11 – рафіноза, 12 – маніт, 13 – інозит, 14 – кукурудзяний крохмаль, 15 – пшеничний крохмаль, 16 – рисовий крохмаль, 17 – соєве борошно. Контроль – середовище, яке містить 2% нерозчинний картопляний крохмаль.

Fig. 2. Effect of different sources of carbon on the synthesis of α -amylase by *Achromobacter sp. 7a*

Note: 1 – control, 2 – xylose, 3 – arabinose, 4 – glucose, 5 – galactose, 6 – mannose, 7 – rhamnose, 8 – lactose, 9 – maltose, 10 – sucrose, 11 – raffinose, 12 – mannitol, 13 – inositol, 14 – corn starch, 15 – wheat starch, 16 – rice starch, 17 – soy flour. Control – the culture medium, containing the 2% insoluble potato starch.

Синтез α -амілаз залежить також від наявності у поживному середовищі органічних чи неорганічних джерел нітрогену. Зазвичай, як джерело нітрогену, більшість дослідників використовують дріжджовий екстракт, пептон [2] чи їх комбінації [8]. Значно рідше застосовують неорганічні джерела нітрогену: натрій нітрат [1] чи амоній нітрат [6]. При вивченні впливу різних джерел нітрогену на біосинтез α -амілази *Achromobacter sp. 7a* показано (рис. 4), що найкраще фермент синтезувався на середовищі з натрій нітратом, як єдиним джерелом нітрогену.

При використанні дріжджового автолізу, пептону і соєвого борошна значення питомої α -амілазної активності було нижчим, порівняно з контролем (натрій нітратом), а при застосуванні амоній хлориду, амоній сульфату, амоній нітрату і сечовини синтез α -амілази був відсутній взагалі. *Acetomonium sporosulcatum* [12] і *B. subtilis* 147 [1] також найкраще синтезували α -амілази на середовищі з натрій нітратом, як єдиним джерелом нітрогену.

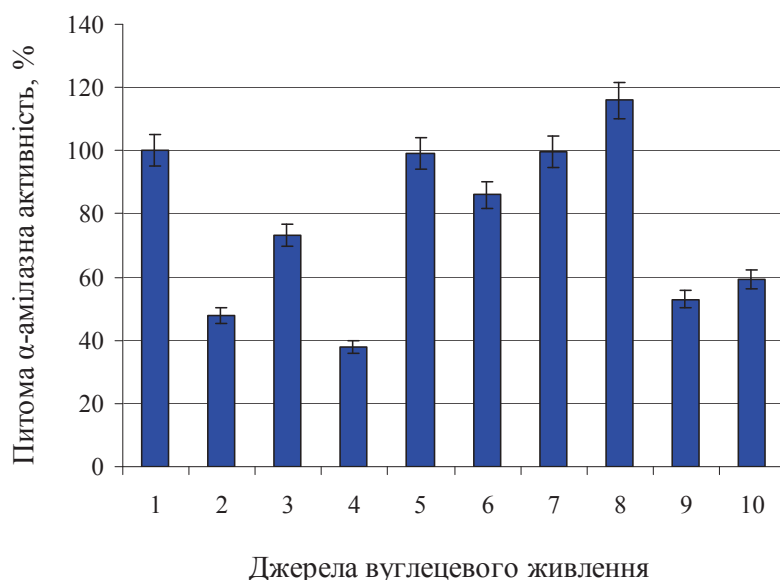


Рис. 3. Вплив різних концентрацій мальтози, солоду і нерозчинного картопляного крохмалю на синтез α -амілази *Achromobacter sp. 7a*

Примітка: 1 – контроль (базове середовище); 2 – розчин мальтози, 2%; 3 – розчин мальтози, 1%; 4 – розчин солоду, 1%; 5, 6, 7 – співвідношення мальтози і нерозчинного картопляного крохмалю: 1:9, 4:6, 1:1; 8, 9, 10 – співвідношення солоду і нерозчинного картопляного крохмалю: 1:9, 4:6, 1:1.

Fig. 3. Effect of different concentrations of maltose, malt and insoluble potato starch on the synthesis of α -amylase by *Achromobacter sp. 7a*

Note: 1 – control (base medium); 2 – maltose solution, 2%; 3 – maltose solution, 1%; 4 – solution malt, 1%; 5, 6, 7 – the ratio of maltose and insoluble potato starch: 1:9, 4:6, 1:1; 8, 9, 10 – the ratio of malt and insoluble potato starch: 1:9, 4:6, 1:1.

Відомо, що окрім джерел карбону і нітрогену важливими факторами є і мінеральні компоненти поживного середовища. Для того, щоб визначити, що саме є значущим у складі солі – аніон чи катіон, було проведено серію однофакторних експериментів. При цьому продуцент вирощували на поживному середовищі з вищепідібраними джерелами карбону і нітрогену, змінюючи лише солі. Так, калій фосфат заміняли на натрій фосфат чи кальцій фосфат, магній сульфат – на магній ацетат чи карбонат, калій хлорид – на калій сульфат чи карбонат, ферум сульфат – на ферум хлорид (табл. 2). Було встановлено, що при заміні калій фосфату на кальцій фосфат, питома α -амілазна активність зростає на 86% (варіант середовища 3), заміщення ж інших солей базового середовища не призводило до інтенсифікації біосинтезу α -амілази (варіанти середовища 1, 2, 4–8).

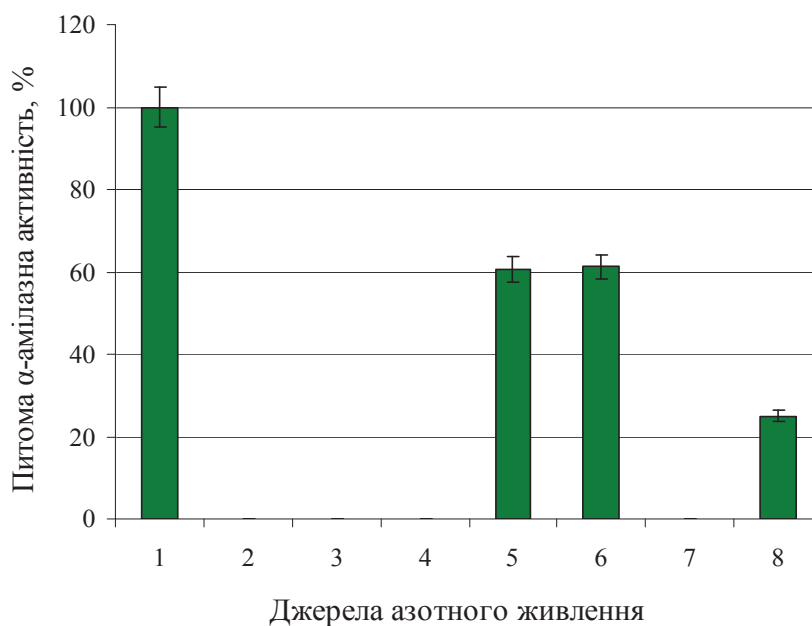


Рис. 4. Вплив різних джерел нітрогену на синтез α -амілази *Achromobacter* sp. 7a

Примітка: 1 – натрій нітрат, 2 – амоній хлорид, 3 – амоній сульфат, 4 – амоній нітрат, 5 – дріжджовий автолізат, 6 – пептон, 7 – сечовина, 8 – соєве борошно. Контроль – середовище, яке містить нітрат натрію.

Fig. 4. Effect of different sources of nitrogen on the synthesis of α -amylase by *Achromobacter* sp. 7a

Note: 1 – sodium nitrate, 2 – ammonium chloride, 3 – ammonium sulfate, 4 – ammonium nitrate, 5 – yeast autolysate, 6 – peptone, 7 – urea, 8 – soy flour. Control – culture medium, containing the nitrate of sodium.

Для знаходження оптимального співвідношення відібраних джерел карбону (солід+нерозчинний картопляний крохмаль у співвідношенні 1:9) та нітрогену (NaNO_3) на тлі постійних рівнів інших факторів середовища проводили двофакторний експеримент на чотирьох рівнях [4]. У поживному середовищі лише калій фосфат замінили на кальцій фосфат. Фактори поживного середовища позначали: X1 – солід+нерозчинний картопляний крохмаль (1:9), X2 – NaNO_3 (табл. 3).

Для кожного фактора визначали межі варіювання. У результаті показано, що підібрані концентрації джерел карбону (18 г крохмалю, 2,2 г солоду на л) і нітрогену (2 г/л) є оптимальними для синтезу α -амілази *Achromobacter* sp. 7a (табл. 4).

Також важливе значення для біосинтезу фермента відіграє і підбір умов культивування, таких як вихідне значення рН поживного середовища, кількість посівного матеріалу, температура вирощування, інтенсивність аерації та об'єм поживного середовища.

Таблиця 2
Підбір компонентів мінерального живлення у середовищі культивування для біосинтезу α -амілази *Achromobacter sp. 7a*

Table 2
Selection of the components of mineral nutrients in the culture medium for the biosynthesis of α -amylase by *Achromobacter sp. 7a*

Варіант середовища	Содійно-калійний карбонатний крохмаль (1:9)	NaNO ₃	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ × 7H ₂ O	KCl	FeSO ₄ × 7H ₂ O	NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	MgCO ₃	Mg(CH ₃ COO) ₂	K ₂ SO ₄	K ₂ CO ₃	FeCl ₂ × 4H ₂ O	Питома активність, %
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100,0
2	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	88,0 ± 4,0
3	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	186,0 ± 9,0
4	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	62,0 ± 2,5
5	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	64,0 ± 3,0
6	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	91,0 ± 4,3
7	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	54,0 ± 2,2
8	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	95,0 ± 4,5

Примітка: контроль – варіант середовища № 1, питому активність на якому приймали за 100%
Note: control – culture medium 1, specific activity which took like 100%



Таблиця 3

Межі варіювання концентрацій основних компонентів поживного середовища культивування *Achromobacter* sp. 7a

Table 3

Limits of variations of nutrient medium main components of *Achromobacter* sp. 7a

Досліджувані фактори	Рівні досліджуваних факторів			
	1	2	3	4
Солод, нерозчинний картопляний крохмаль (1:9), (г/л), X1	9,0 + 1,1	18,0 + 2,2	27,0 + 3,3	36,0 + 4,4
NaNO ₃ , (г/л), X2	1,0	2,0	3,0	4,0

Таблиця 4

Результати повного факторного експерименту для основних компонентів поживного середовища культивування *Achromobacter* sp. 7a

Table 4

Results of full factorial experiment for nutrient medium main components of *Achromobacter* sp. 7a

Варіант	X1	X2	Питома α -амілазна активність, од/мг білка
1	1	1	0,230 \pm 0,010
2	1	2	0,450 \pm 0,020
3	1	3	0
4	1	4	0,490 \pm 0,020
5	2	1	0
6	2	2	0,720 \pm 0,035
7	2	3	0
8	2	4	0
9	3	1	0
10	3	2	0,350 \pm 0,015
11	3	3	0,110 \pm 0,005
12	3	4	0,160 \pm 0,006
13	4	1	0,417 \pm 0,020
14	4	2	0,216 \pm 0,010
15	4	3	0,30 \pm 0,010
16	4	4	0,15 \pm 0,007

Примітка: X1 – солод+нерозчинний картопляний крохмаль (1:9), X2 – NaNO₃; 1, 2, 3, 4 – рівні досліджуваних факторів із таблиці 3

Note: X1 – malt+insoluble potato starch (1:9), X2 – NaNO₃; 1, 2, 3, 4 – the levels of studied factors from Table 3



Відомо, що більшість продуцентів α -амілаз синтезують дані ферменти у середовище культивування за слабо кислих або нейтральних значень рН [2]. Визначення впливу кислотності середовища на продукування α -амілази *Achromobacter sp. 7a* проводили за вихідних значень рН від 4,0 до 11,0. Показано, що досліджений продуцент росте при всіх вищевказаних значеннях рН поживного середовища, однак найвище значення α -амілазної активності спостерігається при вихідному значенні рН 6,0, яке ми приймали за 100% (рис. 5).

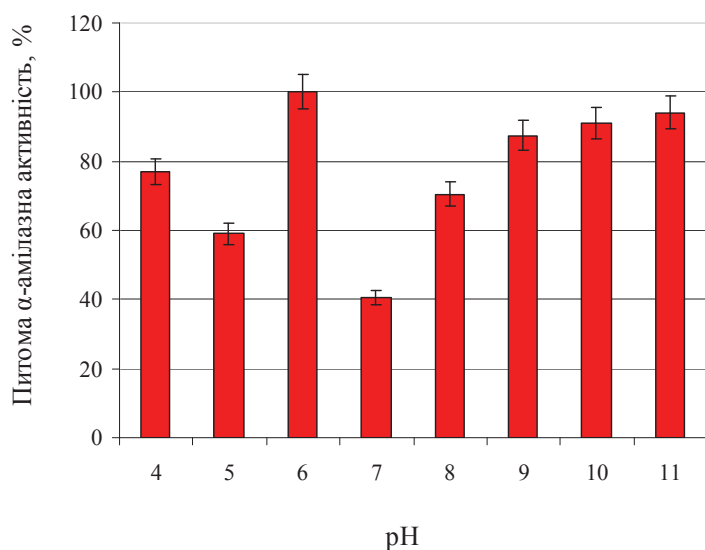


Рис. 5. Вплив вихідного значення рН середовища на синтез α -амілази *Achromobacter sp. 7a*

Примітка: контроль – середовище з вихідним значенням рН 6,0

Fig. 5. Effect of initial pH value for the synthesis of α -amylase by *Achromobacter sp. 7a*

Note: control – nutrient medium with initial pH 6.0

При кислих і лужних значеннях рН вихідного середовища α -амілазна активність *Achromobacter sp. 7a* знижувалася. Найбільше інгібування спостерігалось при нейтральному значенні рН вихідного середовища 7,0. Подібні результати були отримані у випадку α -амілази *B. subtilis* BS5 [5] та *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 [1], які виявляли найвищий рівень активності при вихідному значенні рН середовища 6,0.

Дослідження впливу інтенсивності аерації та об'єму середовища свідчить, що максимальний рівень питомої α -амілазної активності у СКР *Achromobacter sp. 7a* спостерігали за швидкості обертання качалки 210 об/хв, за температури 28 °С і оптимального об'єму 100 мл (табл. 5). Подібна кількість поживного середовища сприяла також інтенсивному синтезу α -амілази *B. subtilis* 147 і *A. flavus* var. *oryzae* 80428 [1].

Вплив кількості посівного матеріалу на біосинтез α -амілази *Achromobacter* sp. 7a відображено на рис. 6. Найвище значення питомої активності ферменту спостерігається при засіві поживного середовища 15% інокулюмом (об'єм/об'єм), хоча зазвичай використовують 2% [2], 5% [8], 8% [2] і 10% [1] інокулюмом.

Таблиця 5

Залежність синтезу α -амілази *Achromobacter* sp. 7a від умов глибинного культивування

Table 5

Dependence of α -amylase synthesis by *Achromobacter* sp. 7a from the submerged cultivation

Об'єм середовища в колбі, мл	Питома активність, од/мг білка					
	24 °C		28 °C		42 °C	
	145 об/хв	250 об/хв	210 об/хв	262 об/хв	168 об/хв	250 об/хв
50	0,960 ± 0,045	0,850 ± 0,040	1,10 ± 0,051	0,870 ± 0,038	1,170 ± 0,055	0,710 ± 0,030
75	1,080 ± 0,050	0,940 ± 0,045	1,060 ± 0,045	1,20 ± 0,055	0,910 ± 0,040	0,650 ± 0,028
100	0,860 ± 0,042	1,110 ± 0,050	1,86 ± 0,088	1,340 ± 0,060	1,290 ± 0,055	1,040 ± 0,048



Рис. 6. Вплив кількості посівного матеріалу на синтез α -амілази *Achromobacter* sp. 7a

Fig. 6. Effect of the number of seed grain on the synthesis of α -amylase by *Achromobacter* sp. 7a

Отже, у результаті проведених досліджень питома активність α -амілази *Achromobacter* sp. 7a зросла у 4 рази при вирощуванні на поживному сере-



довищі такого складу (г/л): NaNO_3 – 2,0; $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ – 0,89; KCl – 0,05; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0015; нерозчинний картопляний крохмаль – 18,0; солод – 2,2 за температури 28 °С, вихідного значення рН середовища 6,0, об'єму поживного середовища 100 мл та інтенсивності перемішування 210 об/хв.

Автори висловлюють щиру подяку к.б.н. Шепелевич В.В. і Зеленій П.П. (Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, Інститут біології, кафедра мікробіології та загальної імунології) за ідентифікацію культури *Achromobacter sp. 7a*.

Е.В. Авдюк¹, Л.Д. Варбанец¹, В.А. Іваньця²

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
ул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна, тел.: +38(044) 526 23 39,
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

²Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

ОПТИМІЗАЦІЯ УСЛОВІЙ КУЛЬТИВУВАННЯ *ACHROMOBACTER SP. 7A* – ПРОДУЦЕНТА α -АМИЛАЗЫ

Реферат

Цель. Оптимизировать условия культивирования продуцента α -амилазы *Achromobacter sp. 7a* для повышения уровня её биосинтеза. **Методы.** При изучении влияния разных источников углерода и азота на биосинтез α -амилазы крахмал и натрий нитрат в базовой питательной среде заменяли на различные углеводы и источники азота в количестве, эквивалентном к общему содержанию углерода (44,4%) и азота (16,5%) в базовой среде. Активность α -амилазы определяли йодометрическим методом, содержание белка – методом Lowry et al. Для выявления значущих элементов минерального питания базовой среды проводили отсеивающий эксперимент. Определение оптимальных концентраций источников углерода и азота в питательной среде проводили путём двойного факторного эксперимента на четырёх уровнях. **Результаты.** Установлено, что самый высокий уровень синтеза фермента наблюдается на 3 сутки глубинного культивирования. Показано, что смесь солода с крахмалом в соотношении 1:9 и натрий нитрат выступают оптимальными источниками углерода и азота для максимального продуцирования фермента, соответственно. Установлено оптимальные условия биосинтеза α -амилазы: температура 28 °С, исходное значение рН среды 6,0, объём питательной среды 100 мл, количество посевного материала 15% и интенсивность перемешивания 210 об/мин. **Выводы.** По результатам двойного факторного эксперимента и подбора оптимальных параметров и условий культивирования продукция α -амилазы *Achromobacter sp. 7a* была повышена в 4 раза.

Ключевые слова: α -амилаза, *Achromobacter sp.*, оптимизация, двойной факторный эксперимент.



K.V. Avdiyuk¹, L.D. Varbanets¹, V.O. Ivanytsia²

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, 154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, GSP, D03680, Ukraine, tel.: +38(044) 526 23 39,
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

²Odessa I.I.Mechnykov National University, 2, Dvoryanska str., Odessa, 65082, Ukraine

OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS FOR α -AMYLASE PRODUCER *ACHROMOBACTER SP. 7A*

Summary

Aim. The investigation of the optimal conditions for α -amylase production by *Achromobacter sp. 7a*. **Methods.** For studying the effect of different sources of carbon and nitrogen on the α -amylase biosynthesis the starch and sodium nitrate in a base culture medium were replaced by the various sources of nitrogen and carbohydrates in an amount equivalent to the total carbon content (44.4%) and nitrogen (16.5%) in the basic medium. α -Amylase activity was determined by iodometric method, protein content – by Lowry et al. The screening experiments were carried out to identify the significant mineral nutrients of base medium. Determination of optimal concentrations of carbon and nitrogen sources in the medium was carried out by bifactorial experiment on four levels. **Results.** It is established that the highest level of enzyme synthesis is observed on the 3 day of deep cultivation. It is shown that mix of malt with starch in the ratio 1:9 and nitrate of sodium are the optimum sources of carbon and nitrogen respectively, for the maximum enzyme producing. The optimum conditions of α -amylase biosynthesis were established: temperature is 28 °C, initial pH value 6.0, the volume of a nutrient medium is 100 ml, number of seed material 15% and intensity of hashing 210 rpm. **Conclusions.** The α -amylase production was risen fourfold as a result of bifactorial experiment and selection of optimum conditions of cultivation of *Achromobacter sp. 7a*.

Key words: α -amylase, *Achromobacter sp.*, optimization, bifactorial experiment.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Авдіюк К.В. α -Амілази *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 і *Bacillus subtilis* 147: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 2013. – 24 с.
2. Авдіюк К.В., Варбанець Л.Д. Мікробні α -амілази: фізико-хімічні властивості, субстратна специфічність та доменна організація // Укр. біохім. журн. – 2013. – 85, № 4. – С. 5–19.
3. Варбанець Л.Д., Борзова Н.В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. – Київ: Наук. думка, 2010. – 440 с.
4. Нідялкова Н.А., Мацелюх О.В., Варбанець Л.Д. Оптимізація середовища для синтезу фібринолітичної пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB В-7324 // Біотехнологія. – 2012. – 5, № 4. – С. 74–81.
5. Femi-Ola T.O., Olowe B.M. Characterization of alpha amylase from *Bacillus subtilis* BS5 isolated from *Amitermes evuncifer* Silvestri // Res. J. Microbiol. – 2011. – 6, N 2. – P. 140–146.



6. Gangadharan D., Sivaramakrishnan S., Nampoothiri K.M., Sukumaran R.K., Pandey A. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* // *Biores. Technol.* – 2008. – 99, N 11. – P. 4597–4602.
7. Goyal N.A., Gupta J.K., Soni S.K. A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch // *Enzym. Microb. Technol.* – 2005. – 37, N 7. – P. 723–734.
8. Liu X.D., Xu Y. A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: purification and characterization // *Biores. Technol.* – 2008. – 99, N 10. – P. 4315–4320.
9. Mobini-Dehkordi M., Javan F.A. Application of alpha-amylase in biotechnology // *J. Biol. Today's World.* – 2012. – 1, N 1. – P. 39–50.
10. Niu D., Zuo Z., Shi G.-Y., Wang Z.-X. High yield recombinant thermostable α -amylase production using an improved *Bacillus licheniformis* system // *Microb. Cell Fact.* – 2009. – 31, N 8. – P. 58–64.
11. Sundarram A., Murthy T.P.K.. α -Amylase production and applications: a review // *J. Appl. Environ. Microbiol.* – 2014. – 2, N 4. – P. 166–175.
12. Vasant Valaparla K. Purification and properties of a thermostable α -amylase by *Acremonium sporosulcatum* // *Int. J. Biotechnol. Biochem.* – 2010. – 6, N 1. – P. 25–34.

Стаття надійшла до редакції 16.01.2015 р.

