

ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА КОМПОНЕНТЫ АМИЛОЛИТИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ

Цай А.А.¹, Васильева Т.И.¹, Глушечков В.А.^{1,2}, Роденко Н.А.^{1,2}

¹ Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева
ул. Академика Павлова, 1, г. Самара, 443011, РФ; e-mail: annatsay2001@mail.ru

² Самарский федеральный исследовательский центр РАН
Студенческий переулок, 3А, г. Самара, 443001, РФ; e-mail: t.rodenko@mail.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0531

Аннотация. В работе изучается влияние импульсного магнитного поля (ИМП) на фермент (α -амилазу) и субстрат (крахмал) и на процесс протекания ферментативной реакции. Обработка ИМП проводилась на магнитно-импульсной установке МИУ-15. Вещества в порошкообразном виде обрабатывались коротким однократным импульсом с различной напряженностью H магнитного поля. Крахмал (30 мг) в пенициллиновом флаконе обрабатывали ИМП с напряженностями $H = 0,09 \cdot 10^6$ А/м, $H = 0,30 \cdot 10^6$ А/м и $H = 0,45 \cdot 10^6$ А/м, амилазу (10 мг) обрабатывали ИМП на той же установке при напряженностях $H = 0,03 \cdot 10^6$ А/м, $H = 0,09 \cdot 10^6$ А/м и $H = 0,45 \cdot 10^6$ А/м. Опытные и контрольные пробы, содержащие обработанный и не обработанный ИМП компонент ферментативной реакции, инкубировали при 37 °С в течение 30 минут. Ферментативную активность определяли стандартным методом, используя реакцию Сакса. Оптическую плотность измеряли при длине волны 590 нм. Была показана устойчивость α -амилазы и крахмала к ИМП при различных напряженностях магнитного поля. Предполагается, что устойчивость фермента может быть связана с его структурой, содержащей стабилизирующие ионы кальция.

Ключевые слова: амилаза, крахмал, импульсное магнитное поле, ферментативная активность.

В настоящее время изучается влияние магнитного поля на биологические системы. Известны данные о влиянии импульсного магнитного поля на ферменты [1-3] и вещества, обладающие сродством к активному центру [4]. Результатом таких работ являлось изменение активности фермента. Эффект влияния всегда противоречив и зависит от вида магнитного поля, его интенсивности, биологической системы, в которой происходит ферментативная реакция. Механизм воздействия магнитного поля может быть выявлен при действии магнитного поля на изолированные молекулы.

Поскольку ферменты широко применяются в разных областях промышленности и медицины, обработка магнитным полем может использоваться для повышения эффективности биотехнологических процессов. Одним из наиболее важных промышленных ферментов является амилаза. В связи с широким применением амилаз в промышленности, а также с интересом познания механизма воздействия ИМП на фермент и субстрат, целью нашей работы являлось изучение влияния импульсного магнитного поля на компоненты амилолитической реакции.

Магнитно-импульсная установка (МИУ) представляет собой генератор однократных импульсов тока, который содержит высоковольтный емкостный накопитель энергии. Основные характеристики МИУ определяются параметрами компонентов накопителя энергии: импульсных высоковольтных конденсаторов, разрядников и элементами зарядного блока [5].

Магнитно-импульсная обработка веществ проводилась по следующей схеме (рис. 1):

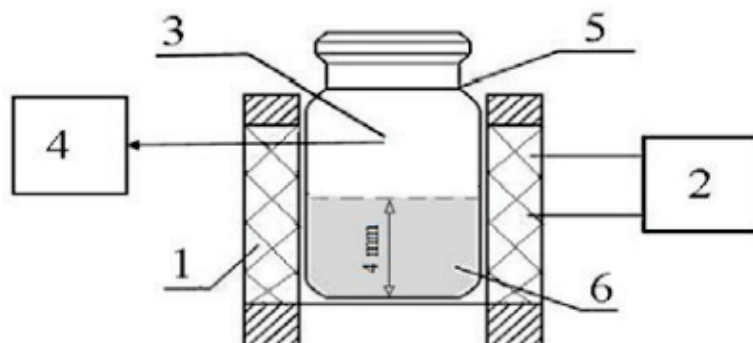


Рисунок 1. Схема магнитно-импульсной обработки веществ

Обозначения: индуктор (1), генератор импульсного тока (2), датчик замера напряженности ИМП (3) и осциллограф (4). Датчик ИМП (3) соединен с осциллографом (4). В индуктор (1) вставляется флакон (5) с порошкообразным веществом (6), после чего происходит обработка ИМП

Таблица 1. Параметры воздействия ИМП на крахмал и амилазу в порошкообразном виде

| Напряжение, кВ | Энергия, кДж | Частота f, кГц | Напряженность $H \cdot 10^6$, А/м | Количество импульсов, n |
|----------------|--------------|----------------|------------------------------------|-------------------------|
| 1 | 0,05 | 40 | 0,03 | 1 |
| 3 | 0,45 | | 0,09 | |
| 10 | 5,08 | | 0,30 | |
| 15 | 11,4 | | 0,45 | |

При протекании по индуктору (1) импульса тока вокруг индуктора создается переменное магнитное поле, которое наводит в обрабатываемой заготовке вихревые токи, имеющие обратное по отношению к току индуктора направление.

Силовое воздействие со стороны индуктора осуществляется дистанционно, то есть без механического или электрического контакта между инструментом и обрабатываемой заготовкой (веществом) [6].

α -амилазу грибную Амилоризин (Биопрепарат, Россия), полученную на основе штамма *Aspergillus oryzae*, и картофельный крахмал (Реахим, Россия) в порошкообразном виде обрабатывали ИМП на магнитно-импульсной установке МИУ-15, сконструированной в Самарском университете.

Крахмал (30 мг) в пенициллиновом флаконе обрабатывали ИМП при напряженностях магнитного поля $H = 0,09 \cdot 10^6$ А/м, $H = 0,30 \cdot 10^6$ А/м, $H = 0,45 \cdot 10^6$ А/м, амилазу (10 мг) обрабатывали на той же установке при напряженностях магнитного поля $H = 0,03 \cdot 10^6$ А/м, $H = 0,09 \cdot 10^6$ А/м, $H = 0,45 \cdot 10^6$ А/м (табл. 1).

Осциллограмма тока при воздействии ИМП представлена на рисунке 2.

Активность α -амилазы определяли стандартным методом [7], используя реакцию Сакса. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью критерия Стьюдента, уровень значимости $P \leq 0,05$.

Для определения активности амилазы 2 мл крахмала, приготовленного на 0,9% NaCl, 2 мл буфера и 0,4 мл ферментативного раствора инкубировали при 37 °С в течение 30 минут. Одновременно ставили контрольную пробу, содержащую 2 мл крахмала и 2,4 мл буфера. После инкубации добавляли 0,8 мл 0,5N HCl для остановки реакции и 0,1 мл р-ра Люголя. Оптическую плотность (ОП) измеряли при длине волны 590 нм. Раствор обнуления содержал 2 мл 0,9% NaCl, 2 мл буфера и 0,4 мл ферментативного раствора.

Для расчета активности амилазы использовали следующую формулу (1):

$$A = \frac{(D_k - D_o) \times m_1}{D_k \times t \times m_2} \quad (1)$$

где A – активность фермента, которая выражается в массе крахмала (в граммах), которую гидролизует 1 г амилазы за 1 минуту, D_k – ОП для контроля, D_o – ОП для опыта, m_1 – масса крахмала, m_2 – масса амилазы, t – время (в минутах).

В опыте по обработке ИМП крахмала мы получили, что ферментативная активность амилазы, гидролизующей крахмал, достоверно не отличается от контроля (рис. 3).

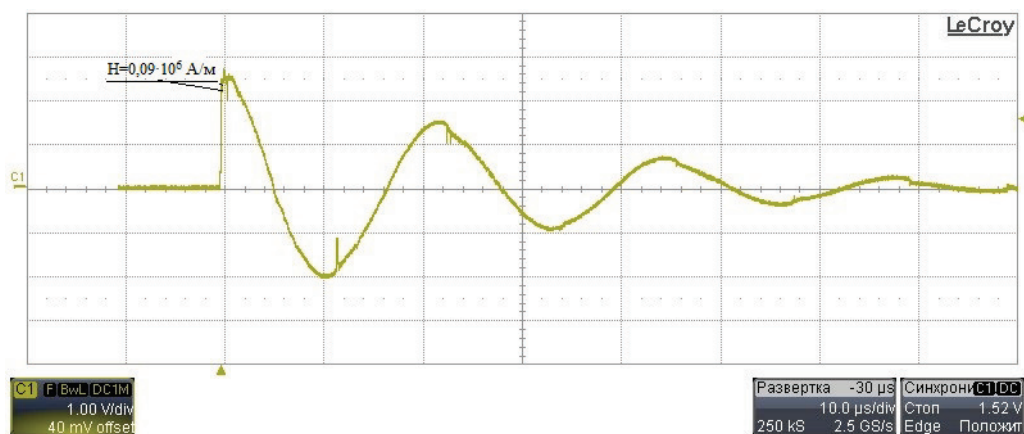


Рисунок 2. Осциллограмма разрядного тока при напряженности магнитного поля $H = 0,09 \cdot 10^6$ А/м импульсного магнитного поля

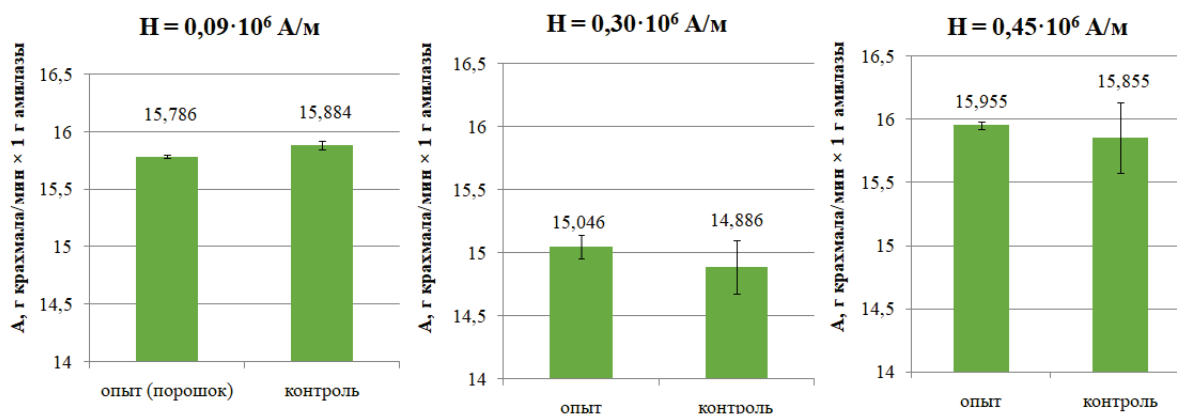


Рисунок 3. Активность амилазы при взаимодействии с обработанным и необработанным ИМП субстратом (крахмалом) при различных напряжённостях магнитного поля

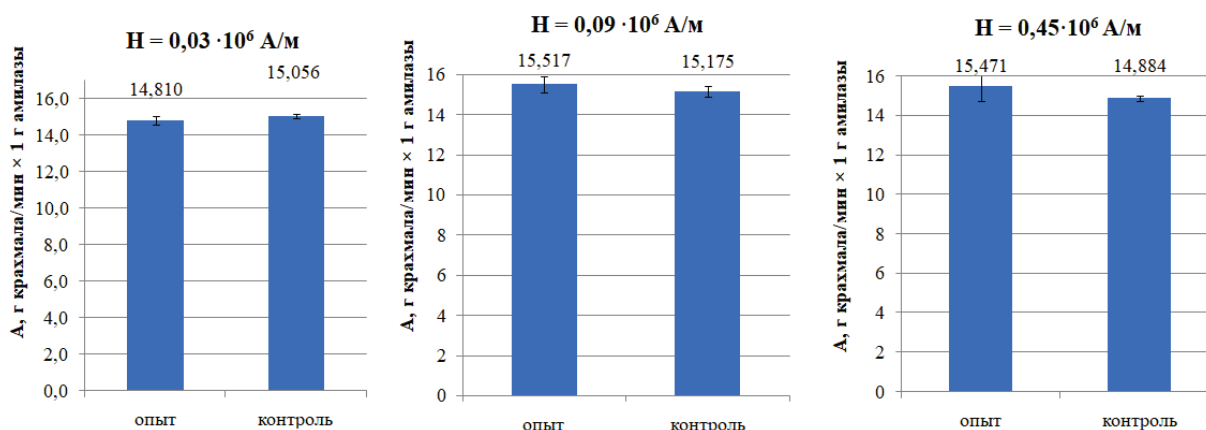


Рисунок 4. Активность обработанной и необработанной ИМП амилазы при различных напряжённостях магнитного поля

При воздействии ИМП на амилазу достоверных отличий от контроля также не было зафиксировано (рис. 4).

В таблице 2 представлены результаты эксперимента по изучению активности амилазы при взаимодействии с обработанным и необработанным ИМП субстратом (крахмалом) и активность обработанной и необработанной ИМП амилазы при различных напряженностях магнитного поля. Контрольный образец не подвергался воздействию ИМП.

Показано отсутствие достоверных отличий активности амилазы в отличие от контроля при воздействии ИМП на порошок крахмала при напряженностях магнитного поля $H = 0,09 \cdot 10^6$ А/м, $H = 0,30 \cdot 10^6$ А/м и $H = 0,45 \cdot 10^6$ А/м, а также отсутствие достоверных отличий активности обработанной ИМП амилазы при напряженностях магнитного поля $H = 0,03 \cdot 10^6$ А/м, $H = 0,09 \cdot 10^6$ А/м и $H = 0,45 \cdot 10^6$ А/м в отличие от необработанной. Таким образом, крахмал и амилаза устойчивы к действию импульсного магнитного поля при исследуемых параметрах. Предполагается, что это может быть связано с большим размером молекул, которые не успевают перестроиться за короткий однократный импульс. Устойчивость амилазы к действию магнитного поля предположительно можно объяснить входящими в ее состав ионами кальция.

Таблица 2. Активность амилазы до и после воздействия ИМП на субстрат (крахмал) и активность амилазы до и после воздействия ИМП на фермент при различных напряженностях магнитного поля

| Обработанный ИМП компонент реакции | | Крахмал | | | Амилаза | | |
|--|----------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Напряжение U, кВ | | 3 | 10 | 15 | 1 | 3 | 15 |
| Напряженность $H \cdot 10^6$, А/м | | 0,09 | 0,30 | 0,45 | 0,03 | 0,09 | 0,45 |
| Активность амилазы (г крахмала/мин \times 1 г амилазы) | Опыт | 15,786 \pm 0,017 | 15,046 \pm 0,093 | 15,955 \pm 0,031 | 14,810 \pm 0,120 | 15,517 \pm 0,262 | 15,470 \pm 0,138 |
| | Контроль | 15,884 \pm 0,034 | 14,886 \pm 0,211 | 15,855 \pm 0,281 | 15,056 \pm 0,242 | 15,175 \pm 0,403 | 14,884 \pm 0,765 |

Список литературы/References:

1. Snine M.B., Guruprasad K.N., Anand Anjali. Enhancement of germination, growth, and photosynthesis in soybean by pre-treatment of seeds with magnetic field. *Bioelectromagnetics*, 2011, no. 32, pp. 474-484.
2. Минникова Т.В., Денисова Т.В., Колесников С.И. Влияние совместного воздействия переменных магнитных полей промышленной частоты 50 Гц и загрязнения никелем на ферментативную активность и фитотоксичность чернозёма Керченского полуострова. *Научный журнал КубГАУ*, 2015, № 112 (08). [Minnikova T.V., Denisova T.V., Kolesnikov S.I. Influence of joint influence of variation magnetic fields of the industrial frequency of 50 Hz and contamination by nickel on enzyme activity and phytotoxicity of the chernozem of the Southern of the half-island of Kerch. *Scientific Journal of KubSAU*, 2015, no. 112 (08). (In Russ.)]
3. Чеботарева Е.Г., Бородулин В.Б., Горошинская И.А., Бабушкина И.В., Фомина Н.Ю., Моррисон В.В., Усанов А.Д., Скрипаль А.В., Усанов Д.А. Влияние магнитного поля на активность фермента лактатдегидрогеназы. *Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки*, 2006, № 4, с. 80-83. [Chebotareva E.G., Borodulin V.B., Goroshinskaya I.A., Babushkina I.V., Fomina N.Yu., Morrison V.V., Usanov A.D., Skripal A.V., Usanov D.A. E.G. The effect of the magnetic field on the activity of lactate dehydrogenase enzyme. *News of universities. The North Caucasus region. Natural Sciences*, 2006, no. 4, pp. 80-83. (In Russ.)]
4. Васильева Т.И., Беляева И.А., Глушченков В.А., Роденко Н.А. Магнитные эффекты антибактериального действия облученного бензилпенициллина натриевой соли. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*, 2018, т. 20, № 5(2), с. 307-316. [Vasilyeva T.I., Belyaeva I.A., Glushchenkov V.A., Rodenko N.A. The magnetic effects of antibacterial effect of radiation benzylpenicillin sodium salt. *News of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2018, vol. 20, no. 5(2), pp. 307-316. (In Russ.)]
5. Юсупов Р.Ю. Универсальные и специальные магнитно-импульсные установки нового поколения. *Вестник Самарского государственного аэрокосмического университета им. академика С.П. Королёва (Национального исследовательского университета)*, 2012, № 5-2 (36), с. 125-130. [Yusupov R.Yu. Multipurpose and specialized pulse-magnetic installations of new vintage. *Bulletin of Samara State Aerospace University named after Academician S.P. Korolev (National Research University)*, 2012, no. 5-2 (36), pp. 125-130. (In Russ.)]
6. Прокофьев А.Б., Беляева И.А., Глушченков В.А., Карпукhin В.Ф., Черников Д.Г., Юсупов Р.Ю. *Магнитно-импульсная обработка материалов (МИОМ): монография*. Самара: АНО «Издательство СНЦ», 2019, 140 с. [Prokofiev A.B., Belyaeva I.A., Glushchenkov V.A., Karpukhin V.F., Chernikov D.G., Yusupov R.Yu. *Magnetic pulse processing of materials (MIOM): monograph*. Samara: ANO "SNC Publishing House", 2019, 140 p. (In Russ.)]
7. Кленова Н.А., Макурина О.Н., Писарева Е.В., Языкова М.Ю. *Спецпрактикум по биохимии животных, растений и микроорганизмов. Учебное пособие*. Самара: Изд-во «С-Принт», 2013, 148 с. [Klenova N.A., Makurina O.N., Pisareva E.V., Yazykova M.Yu. *Special practice on biochemistry of animals, plants and microorganisms. Study guide*. Samara: Publishing house "S-Print", 2013, 148 p. (In Russ.)]

THE EFFECT OF AN IMPULSE MAGNETIC FIELD ON THE COMPONENTS OF THE AMYLOLYTIC REACTION**Tsay A.A.¹, Vasilyeva T.I.¹, Glushchenkov V.A.^{1,2}, Rodenko N.A.^{1,2}**¹ Samara National Research University named after academician S.P. Korolev
*Academician Pavlov str., 1, Samara, 443011, Russia; e-mail: annatsay2001@mail.ru*² Samara Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences
Studentskiy pereulok, 3A, Samara, 443001, Russia; e-mail: t.rodenko@mail.ru

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0531

Abstract. The effect of a pulsed magnetic field (PMF) on the enzyme (α -amylase) and a substrate (starch) and the enzymatic reaction process is studied. The PMF treatment was carried out on a pulse-magnetic installation MIU-15. The substances represented by the powder were treated with short single pulse with different magnetic field strengths H . Starch (30 mg) in penicillin vial was treated by the PMF with intensities of $H = 0.09 \cdot 10^6$ A/m, $H = 0.30 \cdot 10^6$ A/m and $H = 0.45 \cdot 10^6$ A/m, amylase (10 mg) was treated by the same unit at intensities of $H = 0.03 \cdot 10^6$ A/m, $H = 0.09 \cdot 10^6$ A/m and $H = 0.45 \cdot 10^6$ A/m. Experimental and control samples containing the PMF-treated and untreated component of the enzymatic reaction were incubated at 37°C for 30 minutes. The enzymatic activity was determined by the standard method using Sachs' reaction. The optical density was measured at a wavelength of 590 nm. The resistance of α -amylase and starch to the PMF was shown at various magnetic field strengths. It is assumed that the stability of the enzyme may be related to its structure containing stabilizing calcium ions.

Key words: *amylase, starch, pulsed magnetic field, enzymatic activity.*