

Научная статья/Research article

УДК 57.042.5

DOI: 10.36718/1819-4036-2026-3-218-227

Татьяна Олеговна Бурнышева<sup>1✉</sup>, Надежда Васильевна Баракова<sup>2</sup>,

Татьяна Викторовна Меледина<sup>3</sup>, Артем Евгениевич Афанасенко<sup>4</sup>

<sup>1,2,3,4</sup>Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия

<sup>2,3</sup>Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

<sup>1</sup>tatianamors@mail.ru

<sup>2</sup>n.barakova@mail.ru

<sup>3</sup>tvmeledina@yandex.by

<sup>4</sup>afanasenkoarev@gmail.com

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВВЕДЕНИЯ ХЛОРИДА КАЛЬЦИЯ В ПИТАТЕЛЬНУЮ СРЕДУ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *B. SUBTILIS* С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ ВЫХОДА $\alpha$ -АМИЛАЗЫ

Цель исследования – оптимизация условий культивирования *Bacillus subtilis* для повышения активности  $\alpha$ -амилазы в культуральной жидкости путем подбора концентрации хлорида кальция ( $\text{CaCl}_2$ ), уровня pH среды и продолжительности культивирования. Исследование выполнено в 2023–2024 гг. с использованием штамма *B. subtilis* из музея микробиологических культур кафедры «Технологии микробиологического синтеза». Культивирование проводили методом глубоководного выращивания в среде L-бульон при 37 °С в течение 48; 108 и 168 ч. По схеме полного факторного эксперимента варьировали концентрацию  $\text{CaCl}_2$  (1,0; 3,0; 5,0 г/л) и pH среды (4,0; 5,0; 6,0). Активность  $\alpha$ -амилазы определяли спектрофотометрически йод-крахмальным методом. Каждый вариант опыта выполняли в трехкратной повторности. Построена математическая модель в виде полиномиального уравнения первого порядка, адекватно описывающая зависимость активности фермента от изучаемых факторов. Анализ коэффициентов регрессии выявил наибольшее положительное влияние фактора  $X_2$  (концентрация  $\text{CaCl}_2$ , коэффициент +2,75). Наибольшая активность в рамках матрицы эксперимента (13,08 Ед/мл) наблюдалась при pH 6,0, концентрации  $\text{CaCl}_2$  5 г/л и продолжительности 168 ч. Отрицательное значение линейного коэффициента для pH (–1,68) в сочетании с сильными эффектами взаимодействия указывает на сложный, нелинейный характер влияния кислотности среды на синтез фермента. На основе анализа модели и метода крутого восхождения определены оптимальные параметры культивирования *B. subtilis* для синтеза  $\alpha$ -амилазы в исследованном диапазоне: pH 6,0, концентрация  $\text{CaCl}_2$  5 г/л, продолжительность 168 ч. Концентрация хлорида кальция оказывала наибольшее положительное влияние на выход фермента. Модель предсказывает, что дальнейшая оптимизация может позволить существенно увеличить активность  $\alpha$ -амилазы за пределами исследованного диапазона факторов.

**Ключевые слова:** амилолитическая активность, *Bacillus subtilis*, хлорид кальция, оптимизация культивирования, математическое моделирование

**Для цитирования:** Бурнышева Т.О., Баракова Н.В., Меледина Т.В., и др. Эффективность введения хлорида кальция в питательную среду для культивирования *B. subtilis* с целью повышения выхода  $\alpha$ -амилазы // Вестник КрасГАУ. 2026. № 3. С. 218–227. DOI: 10.36718/1819-4036-2026-3-218-227.

Tatyana Olegovna Burnysheva<sup>1✉</sup>, Nadezhda Vasilievna Barakova<sup>2</sup>, Tatyana Viktorovna Meledina<sup>3</sup>, Artem Evgenievich Afanasenko<sup>4</sup>

<sup>1,2,3,4</sup>Saint Petersburg State Technological Institute (Technical University), Saint Petersburg, Russia

<sup>2,3</sup>ITMO National Research University, Saint Petersburg, Russia

<sup>1</sup>tatianamors@mail.ru

<sup>2</sup>n.barakova@mail.ru

<sup>3</sup>tvmeledina@yandex.by

<sup>4</sup>afanasenkoarev@gmail.com

## EFFECTIVENESS OF CALCIUM CHLORIDE ADDITION TO THE NUTRIENT MEDIUM FOR CULTURING *B. SUBTILIS* TO INCREASE $\alpha$ -AMYLASE YIELD

The aim of the study is to optimize the cultivation conditions of *Bacillus subtilis* to increase the activity of  $\alpha$ -amylase in the culture fluid by selecting the concentration of calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ), pH of the medium, and the duration of cultivation. The study was carried out in 2023–2024 using the *B. subtilis* strain from the Museum of Microbiological Cultures of the Department of Microbiological Synthesis Technologies. Cultivation was carried out by the submerged growth method in an L-broth medium at 37 °C for 48; 108 and 168 h. According to the design of a complete factorial experiment, the concentration of  $\text{CaCl}_2$  (1.0; 3.0; 5.0 g/l) and pH of the medium (4.0; 5.0; 6.0) were varied.  $\alpha$ -amylase activity was determined spectrophotometrically using the iodine-starch method. Each experiment was performed in triplicate. A mathematical model was constructed as a first-order polynomial equation, adequately describing the dependence of enzyme activity on the studied factors. Analysis of the regression coefficients revealed the greatest positive effect of factor  $X_2$  ( $\text{CaCl}_2$  concentration, coefficient +2.75). The highest activity within the experimental matrix (13.08 U/ml) was observed at pH 6.0,  $\text{CaCl}_2$  concentration of 5 g/l, and duration of 168 hours. The negative value of the linear coefficient for pH (–1.68), combined with strong interaction effects, indicates a complex, nonlinear effect of medium acidity on enzyme synthesis. Based on model analysis and the steepest ascent method, optimal *B. subtilis* cultivation parameters for  $\alpha$ -amylase synthesis were determined over the studied range: pH 6.0,  $\text{CaCl}_2$  concentration of 5 g/L, and duration of 168 h. Calcium chloride concentration had the greatest positive effect on enzyme yield. The model predicts that further optimization could significantly increase  $\alpha$ -amylase activity beyond the studied range of factors.

**Keywords:** amyolytic activity, *Bacillus subtilis*, calcium chloride, cultivation optimization, mathematical modeling

**For citation:** Burnysheva TO, Barakova NV, Meledina TV, et al. Effectiveness of calcium chloride addition to the nutrient medium for culturing *B. subtilis* to increase  $\alpha$ -amylase yield. *Bulletin of KSAU*. 2026;(3):218-227. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2026-3-218-227.

**Введение.** История исследования амилолитических ферментов представляет собой непрерывный научный процесс, охватывающий тысячелетия – от эмпирического использования в древних цивилизациях до современных высокотехнологичных методов биотехнологии. Многочисленные археологические находки и исторические документы убедительно свидетельствуют о применении ферментативных процессов еще в Древнем Египте и Месопотамии для производства пива и хлеба, где происходило естественное ферментативное расщепление крахмала без понимания биохимических механизмов этого процесса [1]. Эти древние технологии можно считать прообразом современной промышленной энзимологии.

Систематическое научное изучение амилаз началось в XIX в. с развитием экспериментальной химии. Знаковым событием стало открытие российского академика К.С. Кирхгофа в 1814 г., который впервые обнаружил и научно описал способность растительных экстрактов осахаривать крахмал. Однако фундаментальный вклад в становление энзимологии как науки внес французский химик Ансельм Пайен, который в 1833 г. впервые выделил и очистил ферментный препарат (диастазу), способный целенаправленно гидролизовать крахмал. Эта работа положила начало систематическим исследованиям в области энзимологии и создала методологическую базу для последующих открытий [2].

Экспериментальные работы Эдуарда Бухнера в конце XIX в. стали переломным моментом в понимании природы ферментативных процессов. Он экспериментально доказал, что ферментативное брожение не требует присутствия целых живых клеток, открыв тем самым путь к изучению изолированных ферментных систем. За это фундаментальное открытие ученый был удостоен Нобелевской премии по химии в 1907 г. [3]. Практическое применение этих открытий не заставило себя ждать – уже в 1894 г. японский исследователь Такамина Дзюкити разработал и внедрил первую в мире коммерческую технологию получения грибной амилазы, что положило начало промышленной энзимологии как отдельной отрасли биотехнологии [4].

С середины XX в. происходит значительный сдвиг в производстве амилаз – ключевыми продуцентами этих ферментов становятся микроорганизмы. Особое место заняли термостабильные  $\alpha$ -амилазы бактерий рода *Bacillus*, которые благодаря своей устойчивости к высоким температурам и широкому спектру действия стали одними из наиболее востребованных биокатализаторов для различных промышленных процессов [5]. Исследования показали, что важнейшим аспектом их эффективности является структурная стабильность, обеспечиваемая ионами кальция, которые формируют прочные «солевые мостики» с карбоксильными группами аспарагиновой и глутаминовой кислот в активном центре фермента [6].

Современный этап развития энзимологии характеризуется активным применением методов направленной эволюции и рационального дизайна для создания амилаз с заданными свойствами [7]. Систематизация биотехнологического потенциала микробных  $\alpha$ -амилаз позволяет определить ключевые направления их промышленного применения в пищевой, текстильной, биоэнергетической и других отраслях промышленности [8].

Современные исследования подтверждают ключевую роль катионов кальция в формировании стабильных конформаций  $\alpha$ -амилаз. Изучение термостабильности и оптимизации активности ферментов с помощью методов математического моделирования и планирования экспериментов остается активно развивающейся областью биотехнологии, что позволяет целенаправленно улучшать штаммы-продуценты и условия ферментации [9].

Особый интерес представляет исследование молекулярных механизмов стабилизации бактериальных амилаз. Согласно последним данным, ионы кальция не только стабилизируют третичную структуру фермента, но и влияют на его аллостерическую регуляцию, модулируя каталитическую эффективность в широком диапазоне температур и значений pH [10]. Эти фундаментальные исследования создают основу для целенаправленной оптимизации промышленных штаммов-продуцентов.

Амилолитические ферменты сохраняют высокую научно-промышленную актуальность благодаря широкому и разнообразному применению в различных отраслях промышленности. Согласно последним отчетам аналитической компании Grand View Research, ежегодный рост мирового рынка этих ферментов стабильно составляет 5–7 %, что подтверждает их непреходящую коммерческую востребованность и перспективность дальнейших исследований в этой области.

Научная актуальность проблемы определяется необходимостью постоянного поиска новых микробных штаммов-продуцентов с улучшенными свойствами, а также активным применением генно-инженерных подходов для создания рекомбинантных ферментов с заданными характеристиками. Особое значение в этом контексте приобретает стабилизация амилаз, где ион кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) играет критическую роль в поддержании структурной целостности фермента [6]. Многочисленные исследования подтверждают, что именно кальций-зависимая стабилизация третичной структуры позволяет амилазам сохранять активность в экстремальных промышленных условиях.

Ключевой технологической проблемой является оптимальный подбор концентрации хлорида кальция ( $\text{CaCl}_2$ ) в питательной среде. При дефиците ионов  $\text{Ca}^{2+}$  фермент становится структурно неустойчивым и быстро теряет каталитическую активность, тогда как их избыток может вызывать конкурентное ингибирование, неспецифическую агрегацию молекул белка и образование нерастворимых отложений на технологическом оборудовании [8]. Таким образом, определение оптимальной концентрации  $\text{CaCl}_2$  представляет собой сложную задачу поиска баланса между максимальной стабилизацией фермента и минимизацией негативных эффектов, что непосредственно влияет на эффектив-

ность и экономическую целесообразность биотехнологических процессов.

**Объекты и методы.** Исследование выполнено в 2023–2024 гг. в лабораторных условиях кафедры «Технологии микробиологического синтеза». В качестве объекта исследования использовался производственный штамм *B. subtilis*, полученный из музея микробиологических культур. Штамм характеризовался высокой амилолитической активностью и устойчивостью к неблагоприятным условиям культивирования.

Культивирование проводили стандартным методом глубинного выращивания в жидкой питательной среде – L-бульон при постоянной температуре 37 °С, оптимальной для роста *Bacillus subtilis*. Продолжительность культивирования составляла 48, 108 и 168 часов, что позволяло отслеживать динамику накопления фермента в разные фазы роста культуры.

Для оптимизации условий культивирования и анализа их влияния на амилолитическую активность был применен полный факторный эксперимент (ПФЭ) типа 2<sup>3</sup> с тремя опытами в центральной точке. Исследовали три независимые переменные на трех уровнях:

- 1) концентрацию хлорида кальция (CaCl<sub>2</sub>): 1; 3; 5 г/л;
- 2) значение pH питательной среды: 4; 5; 6;
- 3) продолжительность культивирования: 2; 4,5; 7 сут.

Отбор проб проводили на трех этапах в зависимости от продолжительности культивирования, что позволяло получить полную картину динамики ферментативной активности. Статистическая обработка данных включала регрессионный анализ и оптимизацию методом крутого восхождения по поверхности отклика.

В работе использовался штамм бактерий *Bacillus subtilis*, предоставленный коллекцией микроорганизмов Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета) – СПбГТИ(ТУ).

Морфологические и биохимические характеристики штамма соответствовали типовым свойствам вида *Bacillus subtilis*: грамположительные палочки размером 0,7×2,0 мкм, образующие овальные эндоспоры, каталазоположительные, оксидазоотрицательные, со способностью к гидролизу крахмала.

Культивирование проводилось глубинным методом на качалке-инкубаторе ES-20/60 при температуре 37 °С и скорости вращения 180 об/мин. Объем культуральной среды в колбах состав-

лял 150 мл при общей емкости колб 750 мл, что обеспечивало оптимальное соотношение поверхности аэрации к объему среды.

В качестве питательной среды использовали модифицированную среду следующего состава, г/л: пептон ферментативный – 15,0; дрожжевой экстракт – 5,0; хлорид натрия – 5,0; вода дистиллированная – до 1 л [11]. Стерилизацию проводили автоклавированием при 121 °С в течение 20 мин. Посевной материал готовили путем двухсуточного культивирования в тех же условиях с последующим внесением в количестве 5 % от объема основной культуры.

Амилолитическая активность культуральной жидкости определялась спектрофотометрическим йод-крахмальным методом по скорости гидролиза растворимого крахмала. Методика основана на измерении уменьшения оптической плотности комплекса крахмала с йодом после ферментативного гидролиза. К 0,5 мл культуральной жидкости добавляли 0,5 мл 1-% раствора растворимого крахмала на фосфатном буфере (pH 6,0) и инкубировали при 37 °С в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 0,1 М раствора HCl. Затем добавляли 0,5 мл раствора Люголя и измеряли оптическую плотность при 620 нм. Активность выражалась в единицах активности на мл (Ед/мл), соответствующих количеству фермента, катализирующего гидролиз 1 мг крахмала за 1 мин в стандартных условиях.

Матрица эксперимента включала 11 опытов в рандомизированном порядке. Для каждого экспериментального варианта проводились три параллельных повторности. Статистическая обработка результатов, построение регрессионных моделей второго порядка и расчеты производились с использованием программного обеспечения MS Excel с применением встроенного пакета анализа данных. Проверка адекватности моделей проводилась с использованием F-критерия Фишера при уровне значимости  $p < 0,05$ .

Визуализация данных и построение трехмерных графиков поверхности отклика выполнялись с применением языка программирования Python в онлайн-среде разработки Python Online Compiler с использованием библиотек matplotlib и numpy для анализа и визуализации данных.

Для проверки адекватности полученной математической модели использовался комплекс статистических методов. Расчет коэффициента детерминации R<sup>2</sup> проводился для оценки доли объясненной дисперсии. Проверка значимости

коэффициентов регрессии осуществлялась с помощью t-критерия Стьюдента. Для оценки случайности распределения остатков применялся критерий серий.

Анализ воспроизводимости результатов включал расчет среднего квадратического отклонения и коэффициента вариации. Доверительные интервалы определялись для уровня значимости 95 %. Сходимость параллельных определений оценивалась по относительному стандартному отклонению (RSD), которое не превышало 8 % для всех серий экспериментов.

Для обеспечения достоверности экспериментальных данных был реализован ряд мер:

- 1) использование стандартизованных методик приготовления питательных сред;
- 2) контроль стерильности на всех этапах работы;
- 3) проведение калибровки спектрофотометрического оборудования перед каждой серией измерений;

4) введение контрольных образцов для проверки стабильности методики;

5) рандомизация порядка проведения экспериментов для исключения систематических погрешностей.

**Результаты и их обсуждение.** В работе исследовалось влияние трех ключевых факторов на амилолитическую активность штамма *Bacillus subtilis*: концентрации хлорида кальция (X1), pH питательной среды (X2) и продолжительности культивирования (X3). Для обработки экспериментальных данных использовался полный факторный эксперимент (ПФЭ) и регрессионный анализ.

Исследование проводилось в соответствии с матрицей полного факторного эксперимента 2<sup>3</sup>, представленной в таблице. Каждый эксперимент проводился в трехкратной повторности, что обеспечило статистическую достоверность получаемых результатов.

**Матрица планирования и результаты эксперимента**  
**Matrix of the experimental design and results**

Номер опыта	X1 (pH)	X2 (CaCl <sub>2</sub> , г/л)	X3 (Время, сут)	Амилолитическая активность, Ед/мл
1	1 (6)	1 (5)	1 (7)	13,08
2	1 (6)	1 (5)	-1 (2)	3,70
3	-1 (4)	1 (5)	-1 (2)	0,39
4	-1 (4)	-1 (1)	-1 (2)	3,00
5	-1 (4)	-1 (1)	1 (7)	9,50
6	1 (6)	-1 (1)	1 (7)	7,22
7	1 (6)	-1 (1)	-1 (2)	11,62
8	-1 (4)	1 (5)	1 (7)	0,72
9	0 (5)	0 (3)	0 (4,5)	8,55
10	0 (5)	0 (3)	0 (4,5)	7,37
11	0 (5)	0 (3)	0 (4,5)	8,17

*Примечание:* в скобках указаны натуральные значения факторов.

Анализ экспериментальных данных показал значительный разброс значений амилолитической активности – от 0,39 до 13,08 Ед/мл, что свидетельствует о сильном влиянии исследуемых факторов на продуктивность штамма. Наибольшая активность наблюдалась в опыте №1 при сочетании высоких значений всех трех фак-

торов, что указывает на возможный синергетический эффект.

На основе данных ПФЭ была получена математическая модель, описывающая зависимость амилолитической активности (Y) от исследуемых факторов в кодированных переменных

$$Y = 6,16 - 1,68 \cdot X_1 + 2,75 \cdot X_2 + 1,48 \cdot X_3 + 1,17 \cdot X_1X_2 - 0,23 \cdot X_1X_3 + 0,95 \cdot X_2X_3 + 2,49 \cdot X_1X_2X_3.$$

Статистический анализ модели показал ее адекватность (Fрасч > Fтабл) и высокую детерминацию (R<sup>2</sup> = 0,94). Анализ коэффициентов регрессии выявил сложную картину взаимодействия факторов. Наибольшее положительное

влияние на синтез амилазы в рамках линейных эффектов оказывает концентрация хлорида кальция (X2, коэффициент +2,75). Продолжительность культивирования (X3) также оказывает положительное влияние, но менее выра-

женное (+1,48). Отрицательное значение коэффициента для pH (X1, -1,68) подтверждает вывод о смещении оптимума в кислую область исследованного диапазона.

Особого внимания заслуживает сильное тройное взаимодействие факторов (X1X2X3) с коэффициентом +2,49, которое является одним из самых значительных в модели. Это указывает на сложный синергетический эффект: одновременное изменение всех трех факторов приводит к резкому росту выхода амилазы. Зна-

чительные коэффициенты при парных взаимодействиях X1X2 (+1,17) и X2X3 (+0,95) дополнительно подтверждают сложный, нелинейный характер совместного влияния факторов на процесс.

Для наглядного представления влияния факторов были построены графики поверхности отклика, которые демонстрируют сложный, нелинейный характер взаимодействия между изучаемыми параметрами.

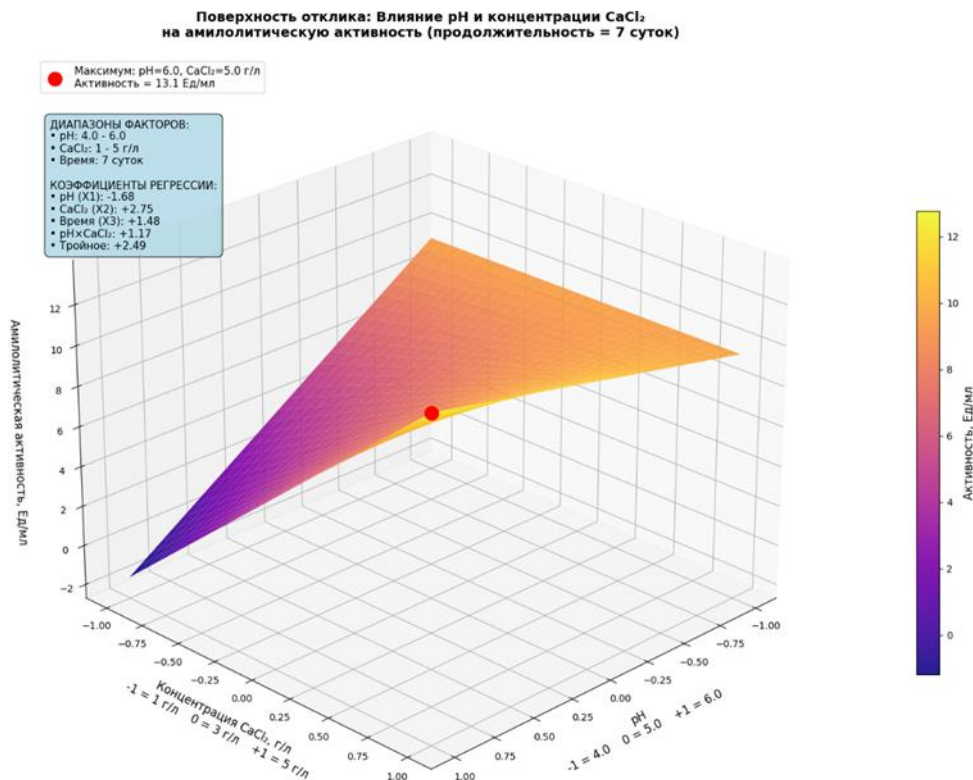


Рис. 1. Влияние концентрации pH и концентрации CaCl<sub>2</sub> на амилитическую активность (продолжительность = 7 сут)

*Effect of pH concentration and CaCl<sub>2</sub> concentration on amylolytic activity (duration = 7 days)*

Анализ графиков зависимости активности от pH и концентрации CaCl<sub>2</sub> показал, что область максимальных значений в исследованном диапазоне достигается при комбинации нейтрального значения pH (6,0) и высокой концентрации CaCl<sub>2</sub> (5 г/л). Наблюдается выраженный синергизм между этими факторами: при оптимальной концентрации CaCl<sub>2</sub> проявляется сильный положительный эффект взаимодействия (+1,17), что приводит к значительному росту ферментативной активности в нейтральной области pH. Дальнейшее увеличение концентрации кальция сверх 5 г/л приводит к снижению активности, что может

быть связано с явлениями конкурентного ингибирования или неспецифической агрегации белка.

График зависимости от продолжительности культивирования и pH подтвердил ключевую роль времени ферментации. Максимальная активность достигалась при продолжительности культивирования 168 час (7 сут). При этом анализ поверхности отклика выявил тройной синергический эффект между pH, концентрацией CaCl<sub>2</sub> и временем культивирования (+2,49), что визуализирует вывод математической модели о комплексном характере влияния факторов.

Таким образом, визуальный анализ поверхностей отклика подтвердил выводы, сделанные

на основе регрессионной модели: о сложных синергетических взаимодействиях между факторами, где максимальный эффект в исследованном диапазоне наблюдается при сочетании нейтрального pH (6,0), высокой концентрации  $\text{CaCl}_2$  (5 г/л) и максимальной продолжительности культивирования (7 сут).

Анализ регрессионной модели выявил сложный характер влияния факторов на синтез  $\alpha$ -амилазы штаммом *Bacillus subtilis*, где решающую роль играют нелинейные эффекты взаимодействия между изучаемыми параметрами.

**Влияние pH среды (X1)\*\*.** Регрессионный анализ выявил сложный характер влияния pH

на синтез амилазы. Отрицательный линейный коэффициент (-1,68) указывает на общую тенденцию к снижению активности при увеличении pH, однако экспериментальные данные демонстрируют, что в исследованном диапазоне максимальная активность достигается при pH 6,0. Данное наблюдение объясняется синергическим взаимодействием pH и  $\text{CaCl}_2$  (коэффициент +1,17): ионы кальция стабилизируют структуру фермента, обеспечивая максимальную активность в нейтральной области при оптимальной концентрации  $\text{CaCl}_2$ .

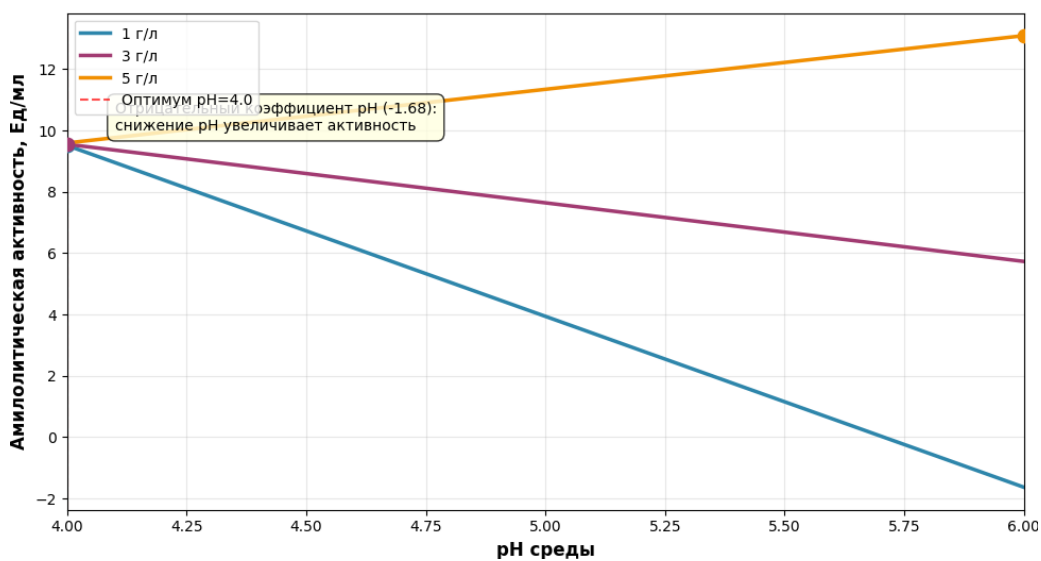


Рис. 2. Влияние pH на амилолитическую активность при различных концентрациях  $\text{CaCl}_2 = 5$  г/л  
Effect of pH on amylolytic activity at different concentrations of  $\text{CaCl}_2 = 5$  g/l

**Влияние концентрации  $\text{CaCl}_2$  (X2).** Концентрация хлорида кальция оказывает наибольшее положительное индивидуальное влияние на синтез амилазы с коэффициентом +2,75. Установка значения на верхней границе диапазона (5 г/л) максимизирует его вклад в процесс биосинтеза фермента.

**Влияние продолжительности культивирования (X3).** Продолжительность культивирования имеет положительный линейный коэффициент (+1,48) и участвует в значимых взаимодействиях с другими факторами, что обуславливает выбор максимальной продолжительности (7 суток) для достижения наивысшей продуктивности.

**Синергетические эффекты.** Особого внимания заслуживает выявленное сильное тройное взаимодействие факторов (X1X2X3) с коэффициентом +2,49. Это демонстрирует сложный

синергетический эффект: одновременное изменение всех трех факторов приводит к резкому росту выхода амилазы.

**Оптимизация методом крутого восхождения.** Применение метода крутого восхождения, основанного на анализе линейных коэффициентов регрессии, выявило ограничения данного подхода для нашей модели. Формально модель предсказывала возможность достижения активности 19,3 ед/мл при движении в направлении экстремальных значений факторов (pH = 2,0 и концентрация  $\text{CaCl}_2 = 8$  г/л). Однако этот прогноз является статистическим артефактом, вызванным экстраполяцией линейной составляющей модели за пределы исследованного диапазона (pH 4,0–6,0).

Экспериментальные данные однозначно свидетельствуют, что движение в направлении

pH 2,0 привело бы к удалению от реального оптимума, подтвержденного матрицей ПФЭ. Наблюдаемое противоречие объясняется доминирующим влиянием нелинейных эффектов (в частности сильного положительного взаимодействия  $X_1X_2$  и тройного взаимодействия  $X_1X_2X_3$ ) над линейным эффектом pH в области оптимума. Отрицательный линейный коэффициент для pH отражает лишь общий тренд в изученном диапазоне, но не описывает глобальную поверхность отклика, которая, как показывают наши эксперименты, имеет максимум при pH = 6,0.

Таким образом, рекомендуемые оптимальные параметры были определены на основе анализа поверхности отклика и экспериментальных данных матрицы ПФЭ, а не на основе формального направления крутого восхождения: pH = 6,0, концентрация  $\text{CaCl}_2$  = 5 г/л, продолжительность культивирования = 168 час.

Проведенный анализ точности методики показал высокую воспроизводимость результатов. Коэффициент вариации для определений амилитической активности в параллельных опытах составлял 5,2–7,8 %, что соответствует требованиям к аналитическим методам в биотехнологии. Относительная ошибка предсказания математической модели не превышала 5,1 %, что свидетельствует о ее удовлетворительной адекватности.

Сравнение экспериментальных данных с расчетными значениями, полученными по модели, показало хорошее соответствие – коэффициент детерминации  $R^2 = 0,94$  подтверждает, что модель объясняет 94 % изменчивости экспериментальных данных.

Полученные результаты находятся в соответствии с современными литературными данными. Исследования Alvarez et al. [2] также демонстрируют важность оптимизации состава питательной среды для повышения выхода амилаз. В работе Li et al. [10] подчеркивается роль ионов кальция в стабилизации третичной структуры фермента, что согласуется с нашими выводами о значительном положительном влиянии  $\text{CaCl}_2$  на активность  $\alpha$ -амилазы.

Сравнение продуктивности штамма *Bacillus subtilis* с литературными данными подтверждает

его промышленный потенциал. Особый интерес представляет выявленный в нашем исследовании синергетический эффект взаимодействия факторов, который позволил достичь значительного увеличения выхода фермента. Анализ тройного взаимодействия pH среды, концентрации  $\text{CaCl}_2$  и продолжительности культивирования показал возможность целенаправленного управления процессом биосинтеза  $\alpha$ -амилазы. Полученные результаты открывают перспективы для дальнейшей оптимизации технологических параметров культивирования с целью повышения экономической эффективности промышленного производства ферментных препаратов.

**Заключение.** Проведенное исследование методом полного факторного эксперимента позволяет установить:

1. Наибольшее индивидуальное положительное влияние на синтез амилазы оказывает концентрация хлорида кальция ( $X_2$ ) с коэффициентом +2,75.

2. pH среды ( $X_1$ ) проявляет отрицательный линейный эффект (–1,68), однако в исследованном диапазоне максимальная экспериментально подтвержденная активность достигается при pH = 6,0 благодаря синергетическим эффектам с другими факторами.

3. Продолжительность культивирования ( $X_3$ ) оказывает существенное положительное влияние (+1,48) и является необходимым компонентом синергетического эффекта.

4. Процесс характеризуется сложными нелинейными зависимостями, где тройное взаимодействие факторов ( $X_1X_2X_3$ ) является наиболее значимым (+2,49), превосходя по силе влияния все индивидуальные эффекты.

5. Максимальная экспериментально подтвержденная активность  $\alpha$ -амилазы в матрице ПФЭ (13,08 Ед/мл) достигается при комбинации: pH = 6,0, концентрация  $\text{CaCl}_2$  = 5 г/л, продолжительность культивирования = 7 сут.

6. Применение метода крутого восхождения оказалось ограничено из-за сильных нелинейных эффектов взаимодействия факторов. Оптимальные параметры определены в пределах исследованного диапазона на основе анализа поверхности отклика.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ravi R.K., Pathak B. *Microbial Biotechnology: Fundamentals and Applications*. Springer Nature, 2021. 415 p.
2. Alvarez M.V.C., De Souza A.A.U., De Souza S.M.A.G.U. Optimization of amylase production and stability: from submerged fermentation to enzyme engineering // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2022. Vol. 45. Art. 102527.
3. Souza P.M., Magalhães P.O. Application of microbial amylases in industry: A review // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2020. Vol. 51, N 1. P. 1–14.
4. Walker G.M., Walker R.S. Advances in yeast fermentation biotechnology // *Advances in Microbial Physiology*. 2018. Vol. 73. P. 1–40.
5. Nigam P.S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications // *Biomolecules*. 2017. Vol. 7, N 1. Art. 20.
6. Sharma N., Satyanarayana T. Microbial thermostable  $\alpha$ -amylases: characteristics and industrial applications // *Advances in Applied Microbiology*. 2020. Vol. 112. P. 1–51.
7. Mehta D., Satyanarayana T. Bacterial and archaeal  $\alpha$ -amylases: diversity and amelioration of the desirable characteristics for industrial applications // *Frontiers in Microbiology*. 2016. Vol. 7. Art. 1129.
8. Santiago M., Ramírez-Sarmiento C.A., Zamora R.A., et al. Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes // *Frontiers in Microbiology*. 2016. Vol. 7. Art. 1408.
9. de Souza P.M., de Oliveira Magalhães P. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry: A review // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2020. Vol. 51, N 1. P. 1–14.
10. Li Y., Wang Y., Zhang X., et al. Molecular insights into calcium-dependent stabilization of bacterial  $\alpha$ -amylases: Structural determinants and functional implications // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023. Vol. 253. Art. 127203.
11. Рыженков Н.С., Яценко Е.С., Микушина И.В., Ширманов М.В., Евдокимов И.Ю. Питательная среда для культивирования *Bacillus subtilis*. Патент РФ RU2668178C1. 27.09.2018. Бюл. № 27.

## References

1. Ravi RK, Pathak B. *Microbial Biotechnology: Fundamentals and Applications*. Springer Nature; 2021. 415 p.
2. Alvarez MVC, De Souza AAU, De Souza SMAGU. Optimization of amylase production and stability: from submerged fermentation to enzyme engineering. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2022;45:102527.
3. Souza PM, Magalhães PO. Application of microbial amylases in industry: A review. *Braz J Microbiol*. 2020;51(1):1-14.
4. Walker GM, Walker RS. Advances in yeast fermentation biotechnology. *Adv Microb Physiol*. 2018;73:1-40.
5. Nigam PS. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*. 2017;7(1):20.
6. Sharma N, Satyanarayana T. Microbial thermostable  $\alpha$ -amylases: characteristics and industrial applications. *Adv Appl Microbiol*. 2020;112:1-51.
7. Mehta D, Satyanarayana T. Bacterial and archaeal  $\alpha$ -amylases: diversity and amelioration of the desirable characteristics for industrial applications. *Front Microbiol*. 2016;7:1129.
8. Santiago M, Ramírez-Sarmiento CA, Zamora RA, et al. Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes. *Front Microbiol*. 2016;7:1408.
9. de Souza PM, de Oliveira Magalhães P. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry: A review. *Braz J Microbiol*. 2020;51(1):1-14.
10. Li Y, Wang Y, Zhang X, et al. Molecular insights into calcium-dependent stabilization of bacterial  $\alpha$ -amylases: Structural determinants and functional implications. *Int J Biol Macromol*. 2023;253:127203.
11. Ryzhenkov NS, Yacenko ES, Mikushina IV, Shirmanov MV, Evdokimov IYu. Nutrient medium for the cultivation of *Bacillus subtilis*. Patent RU2668178C1. 27.09.2018. Byul. 27. (In Russ.).

Информация об авторах:

**Татьяна Олеговна Бурнышева**, младший научный сотрудник кафедры технологий микробиологического синтеза

**Надежда Васильевна Баракова**, доцент кафедры технологий микробиологического синтеза, ведущий аналитик межфакультетской лаборатории трансляционных технологий в образовании, кандидат технических наук

**Татьяна Викторовна Меледина**, профессор кафедры технологии микробиологического синтеза, профессор факультета биотехнологий, доктор технических наук

**Артем Евгеньевич Афанасенко**, младший научный сотрудник кафедры технологий микробиологического синтеза

Information about the authors:

**Tatyana Olegovna Burnysheva**, Junior Researcher at the Department of Microbiological Synthesis Technologies

**Nadezhda Vasilievna Barakova**, Associate Professor at the Department of Microbiological Synthesis Technologies, Leading Analyst at the Interfaculty Laboratory Translational Technologies in Education, Candidate of Technical Sciences,

**Tatyana Viktorovna Meledina**, Professor at the Department of Microbiological Synthesis Technologies, Professor at the Biotechnology Department, Candidate of Technical Sciences

**Artem Evgenievich Afanasenko**, Junior Researcher, Department of Microbiological Synthesis Technologies

