

# ОГЛЯДИ

УДК 577.152.32

## МІКРОБНІ $\alpha$ -АМІЛАЗИ: ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ, СУБСТРАТНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА ДОМЕННА СТРУКТУРА

К. В. АВДІЮК, Л. Д. ВАРБАНЕЦЬ

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ;  
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

В огляді наведено сучасні дані літератури та результати власних досліджень щодо продуцентів, фізико-хімічних властивостей та субстратної специфічності  $\alpha$ -амілаз, які продукуються мікроорганізмами різних таксономічних груп: бактеріями, грибами та дріжджами. Синтез більшості  $\alpha$ -амілаз є індукованим процесом, який стимулюється у присутності крохмалю або продуктів його гідролізу. Оптимізацією умов культивування штамів-продуцентів можна досягти підвищення рівня активності ензимів.  $\alpha$ -Амілази, виділені з різних джерел, відрізняються за своїми фізико-хімічними властивостями, зокрема молекулярною масою, рН- та термооптимумом, інгібіторами і активаторами. Вони здатні гідролізувати  $\alpha$ -1,4- та в деяких випадках  $\alpha$ -1,6-зв'язані залишки глюкози в розчинному крохмалі, амілозі, амілопектині, глікогені, мальтодекстринах,  $\alpha$ - і  $\beta$ -циклодекстринах та інших вуглеводних субстратах.  $\alpha$ -Амілази належать до GH-13 родини глікозил-гідролаз, характерною особливістю яких є наявність каталітичного домену А у вигляді  $(\beta/\alpha)_8$ -циліндра. Крім домену А, у структурі  $\alpha$ -амілаз присутні ще два домени: В і С, які розташовані приблизно з протилежних боків  $(\beta/\alpha)_8$ -циліндра. Переважна більшість відомих  $\alpha$ -амілаз містять у своєму складі  $\text{Ca}^{2+}$ , який знаходиться на поверхні між доменами А і В та відіграє важливу роль у стабільності та активності ензиму.

**Ключові слова:**  $\alpha$ -амілаза, фізико-хімічні властивості, субстратна специфічність, доменна структура.

$\alpha$ -Амілази (3.2.1.1; 1,4- $\alpha$ -D-глюкан-глюканогідролази) є ензимами амілолітичної дії, які належать до класу гідролаз, підкласу глікозидаз. Вони здатні гідролізувати внутрішні  $\alpha$ -1,4-глікозидні зв'язки в крохмалі, глікогені і споріднених їм полі- і олігосахаридах. Це призводить до утворення мальтодекстринів різної молекулярної маси (Мм), а також мальтотріози, ізомальтози і глюкози. Відповідно до складу кінцевих продуктів гідролізу крохмалю  $\alpha$ -амілази можна віднести до двох типів: декстринувальні (розріджувальні), які призводять до утворення мальтоолігосахаридів (мальтопентози і мальтогексози), і цукрогенні, внаслідок дії яких, головним чином, утворюється мальтоза і глюкоза. Такі властивості  $\alpha$ -амілаз використовуються в різних галузях промисловості та сільського господарства для оцукрювання (гідролізу) крохмалевмісної сировини, а саме в хлібопекарській, спиртовій, пивоварній, кондитерській і крохмале-патоковій промисловостях (виробництво паток, сиропів, глю-

кози), у виготовленні круп'яних виробів, овочевих продуктів, виробів із фруктів (соків, сиропів, пектину), дитячого харчування, в текстильній, паперовій промисловості, у виробництві мийних засобів, а також у медицині. Особливості використання  $\alpha$ -амілаз у різних сферах життєдіяльності людини зумовлені різноманітними властивостями ензимів, зокрема особливостями їхньої структурної організації, фізико-хімічними властивостями, субстратною специфічністю, а також штамом-продуцентом [1].

### Джерела мікробних $\alpha$ -амілаз

Здатність до синтезу  $\alpha$ -амілази була виявлена в мікроорганізмів різних екологічних ніш: психрофілів, мезофілів та термофілів. Найпоширенішими продуцентами бактеріальних  $\alpha$ -амілаз є представники роду *Bacillus*, а саме: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cohnii*, *B. polymyxa* [1–6]. Деякі з цих продуцентів синтезують термостабільні ензи-

ми, що дає можливість використовувати їх у різних галузях промисловості [7].

Значну кількість  $\alpha$ -амілаз синтезують *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Serratia*, *Rhizobium* [8]. Амілазу було виявлено також у деяких представників патогенних бактерій (*Vibrio cholerae*, *B. anthracis*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pneumococcus*), хоча промислове значення, звичайно, можуть мати і фактично мають лише непатогенні бактерії [9].

Особливістю більшості ензимних препаратів, що застосовуються в масштабних промислових процесах, є їхня термостабільність [10, 11], що сприяє зниженню собівартості кінцевого продукту за рахунок скорочення часу та кількості електроенергії, необхідних для його одержання [12]. Тому термофільні організми привертають до себе особливу увагу як джерела нових термостабільних ензимів. Продукентами термостабільних ензимів є представники облигатних термофільних архебактерій – родів *Pyrococcus* (*P. furiosus*, *P. woesei*), *Sulfolobus* (*S. solfataricus*, *S. acidocaldarius*) [13, 14], *Thermococcus* (*T. aggregans*, *T. fumicolans*, *T. hydrothermalis*, *T. litoralis*, *T. profundus*) та представників гіпертермофільних еубактерій – родів *Thermotoga* (*T. maritima*), *Thermus* (*T. filiformis*), *Rhodothermus* (*R. marinus*) [14, 15], які були виділені з гарячих джерел, вулканів, гейзерів. Однак дуже важко відтворити природні умови існування під час вирощування екстремально термофільних організмів, особливо в промислових масштабах. Тому альтернативним методом отримання високотермостабільних ензимів є створення рекомбінантних штамів, що продукують ензим із бажаними властивостями. З цією метою як клітини-господарі використовують такі мікроорганізми: *E. coli* [14, 16], *B. subtilis* [16], *Saccharomyces cerevisiae* [14, 17].

З 1990-х років увагу деяких дослідників було спрямовано на вивчення  $\alpha$ -амілаз, які виявляють активність на холоді, так званих «cold-active»  $\alpha$ -амілаз. Продукенти цих ензимів колонізують низькотемпературні екологічні ніші: полярні регіони, гори, глибоководні моря. Вони пристосувалися до умов низьких температур, синтезуючи глікопротеїни та пептиди, які мають властивості антифризів [18]. Здатність до синтезу  $\alpha$ -амілаз, активних за низьких температур, було виявлено в антарктичного психрофіла *Alteromonas haloplanctis* [19], у полярних мікроорганізмів – *Nocardiaopsis*, *Janthinobacterium*, *Duganella*, *Cytophaga*, *Wangia* [20].

Носіями досить активної  $\alpha$ -амілази є гриби родів *Aspergillus* [21–24], *Penicillium* [25], *Mucor* [1, 26], *Rhizopus* [27], *Acremonium* [28], *Trichoderma* [8].  $\alpha$ -Амілаза *Aspergillus* вже протягом багатьох століть використовується у промислому масштабі для виготовлення соєвих соусів і напою «саке» [26].

Продукенти  $\alpha$ -амілаз виявлено і серед актиноміцетів (*Nocardiaopsis* [29], *Nocardia* [1], *Streptomyces* [1], *Thermomonospora* [11, 30], *Thermobifida* [31], *Thermoactinomyces* [11, 30, 32, 33]) та дріжджів (*Cryptococcus* [34], *Saccharomyces* [35]).

Таким чином, представники різних таксономічних груп мікроорганізмів здатні продукувати активні  $\alpha$ -амілази, що відрізняються за своїми властивостями.

### Регуляція синтезу $\alpha$ -амілаз

Синтез  $\alpha$ -амілаз пов'язаний з ростом культури [36]: максимальна кількість їх синтезується наприкінці експоненційної [37, 38] або під час стаціонарної фази росту [27].

Синтез  $\alpha$ -амілаз індукується у присутності крохмалю чи продуктів його гідролізу [12, 24, 26, 36], хоча й існують виключення. Так,  $\alpha$ -амілаза *Pseudomonas* sp. IMD 353 є конститутивним ензимом, який продукується на середовищі, що не містить крохмалю, а основним джерелом вуглецю є 3%-й розчин глюкози [39]. Подібна властивість характерна для  $\alpha$ -амілази *Bacillus* sp. BKL40, яка продукується також за відсутності крохмалю в середовищі культивування [40].

Найчастіше максимальний рівень синтезу  $\alpha$ -амілаз спостерігається під час вирощування продуцента на середовищі із крохмалем. Одні ензими синтезуються в середовищі культивування за високої концентрації крохмалю: 0,6% (*Bacillus* sp. PN5) [30], 1% (*Bacillus* sp. HUTBS62, *Bacillus* sp. A3-15, *A. niger* JGI 24) [4, 11, 21], 1,5% (*B. subtilis* KIBGE-HAR) [7], 2% (*T. thalophilus* KSV 17) [32], а інші – за досить низької його концентрації: 0,025% (*Bacillus* sp. BKL40) [40], 0,1% (*B. subtilis* 147) [41], 0,3% (*B. stearothermophilus* NCIM 2922) [12]. Іноді підвищення концентрації крохмалю може призвести до зниження секреції ензиму, як це спостерігалось у разі з  $\alpha$ -амілазою *B. stearothermophilus* NCIM 2922 [12]. За концентрації крохмалю вище 0,3% виділення ензиму в середовище культивування зменшувалося. Це можна пояснити накопиченням продуктів метаболізму, які виділяються, у разі швидкого розщеплення крохмалю і

пригнічують ріст культури та продукування ензиму [12, 36]. Основним джерелом вуглецю можуть бути й інші вуглеводи, наприклад, лактоза [42], мальтоза [43], галактоза [44], трегалоза [45]. У разі використання глюкози або фруктози, як джерела вуглецю, синтез більшості  $\alpha$ -амілаз пригнічується, що пов'язано з явищем катаболітної репресії [10, 13, 21, 30]. Однак у *B. subtilis* KCC103 у присутності глюкози відсутня репресія синтезу  $\alpha$ -амілази [43].

На синтез  $\alpha$ -амілаз впливає також присутність органічних і неорганічних джерел азоту. Найчастіше як джерело азоту в середовищах культивування для одержання значної кількості  $\alpha$ -амілази використовують триптон (*B. subtilis*) [46], пептон (*Vibrio* sp.) [47], дріжджовий екстракт (*Bacillus* sp. HUTBS62, *T. thalophilus* KSV 17, *A. sporosulcatum*, *Bacillus* sp.) [4, 28, 32, 43] чи їх комбінації (*Bacillus* sp. PN5, *Bacillus* sp. YX-1) [27, 30]. Значно рідше застосовують неорганічні джерела азоту: нітрат натрію (*Aspergillus* sp. 55, *A. sporosulcatum*, *B. subtilis* 147) [24, 28, 41], нітрат амонію (*A. oryzae*) [48]. Іноді додавання органічних і неорганічних джерел азоту знижувало синтез  $\alpha$ -амілази (*B. cereus* MTCC 1305) [49].

Додавання іонів кальцію в середовище культивування стимулювало синтез більшості  $\alpha$ -амілаз [7, 10], оскільки кальцій активує і стабілізує ці ензими. У разі з  $\alpha$ -амілазою *A. oryzae* не спостерігалось активуючої дії кальцію [36]. Цікавим є той факт, що термостабільні  $\alpha$ -амілази більш афінні до іонів кальцію, ніж термолабільні [7]. Деякі аніонні сурфактанти здатні стимулювати синтез  $\alpha$ -амілаз [50].

Окрім складу живильного середовища, важливу роль у синтезі  $\alpha$ -амілаз відіграють також такі фізіологічні параметри, як: температура росту продуцента, рН середовища, інтенсивність перемішування, кількість засівного матеріалу [15, 45].

Температура є визначальним фактором синтезу  $\alpha$ -амілаз. Однак оптимальна температура їх синтезу залежить від того, є культура мезофільною чи термофільною [15]. Так,  $\alpha$ -амілази грибів синтезуються зазвичай за температури 24 °C (*Aspergillus* sp. 55) [24] чи 30 °C (*A. flavus*) [51], а бактеріальні – при 35–37 °C (*B. licheniformis*, *B. mojavensis* A21, *B. cereus*) [2, 3, 52], 42 °C (*B. subtilis* 147) [41], 45 °C (*Bacillus* sp. YX-1) [27]. Проте деякі бактеріальні  $\alpha$ -амілази секретуються в живильні середовища за підвищених температур: 50 °C (*B. stearothermophilus* NCIM 2922, *B. subtilis*, *B. subtilis* KIBGE-HAR) [7, 10, 12],

60 °C (*Bacillus* sp. PN5, *Bacillus* sp. A3-15) [11, 30], 70 °C (*Geobacillus thermoleovorans*) [53].

Оптимальні температури росту і максимального синтезу  $\alpha$ -амілази можуть збігатися [7], але не завжди. Так, оптимальна температура росту *Bacillus* sp. PN5 становить 37 °C, а максимального синтезу  $\alpha$ -амілази – 60 °C [30]. У деяких випадках спостерігається зниження рівня продукування ензиму за температури, вищої за 37 °C. Це пояснюють інактивацією внаслідок високих температур експресії генів, які відповідають за крохмальдеградуючі ензими [54].

Також не менш важливим параметром синтезу  $\alpha$ -амілаз є кислотність живильного середовища. Більшість досліджених  $\alpha$ -амілаз продукували ензим за нейтральних (*B. stearothermophilus* NCIM 2922, *B. subtilis*, *G. thermoleovorans*, *B. subtilis* 147, *B. subtilis* KIBGE-HAR) [7, 10, 12, 41, 53] чи слабко кислих значень рН (*Geobacillus* sp. IPTN) [38], хоча деякі виявляли найвищу здатність до секреції за лужних значень рН (*Bacillus* sp. A3-15, *Bacillus* sp. PN5) [11, 30].

Важливими чинниками, які впливають на синтез ензиму, є також інтенсивність перемішування і кількість засівного матеріалу [15, 36, 45]. Хоча в деяких випадках інтенсивність перемішування не впливає на продукування ензиму, а спричинює лише морфологічні зміни міцелію *A. oryzae* [55]. Кількість інокумуму, що вноситься у середовище культивування, може відрізнятися: 2% (*A. niger*, *A. oryzae*) [22, 48], 5% (*Bacillus* sp. YX-1) [27], 10% (*T. thalophilus* KSV 17, *B. stearothermophilus* NCIM 2922, *B. subtilis* 147) [15, 32, 41].

Продукування  $\alpha$ -амілаз мікроорганізмами здійснюється шляхом глибинного (ГК) [56] чи твердо-фазного культивування (ТФК) [48, 49]. ТФК характеризується низкою переваг над ГК: вищий вихід і спектр продуктів за короткий проміжок часу; краща циркуляція кисню; подібність до природних умов існування для нитчастих грибів; потреба у простому устаткуванні; зменшення енергетичних затрат; кількості генерацій; витрачання води; позбавлення від проблем піноутворення, характерних для ГК; зниження рівня катаболітної репресії. Використання відходів сільськогосподарських виробництв дозволяє знизити проблеми, пов'язані із забрудненням довкілля [15, 21, 57]. Крім того, ціна виробництва ензимів при глибинному культивуванні є високою, оскільки компоненти синтетичних середовищ для вирощування продуцентів є високовартісними [49]. Зниження ціни у разі застосування ТФК можна

досягти шляхом заміни компонентів синтетичних середовищ на економічно вигідні побічні продукти сільськогосподарських виробництв, такі як: пшеничні висівки [58], лушпиння рису [59], шкірки банану [22], жом цукрової тростини [51], маслянисту макуху ґрунтового горіха, кокосу, кунжуту [48], відпрацьоване пивоварне зерно [60] та ін. Однак метод ГК передбачає автоматизацію параметрів процесу, необхідних для оптимального росту [21].

Оскільки досягнення найвищої продуктивності є вирішальним фактором комерційного успіху в будь-якому промисловому процесі [61], з метою покращення потенційної продуктивності мікроорганізмів – продуцентів  $\alpha$ -амілаз, застосовують два основних підходи, пов'язані з модифікацією їхнього геному: 1) класичне удосконалення штаму мутацією або селекцією та 2) використання генетичної рекомбінації шляхом злиття протопластів чи трансформації [62]. Покращити рівень виробництва позаклітинних ензимів можна також, використовуючи стратегії, засновані на молекулярному клонуванні: 1) підвищення рівня експресії збільшенням кількості копій генів; 2) підвищення секреції шляхом модуляції сигнальних пептидів; 3) видалення генів, які кодують синтез невідповідних позаклітинних ензимів; 4) підвищення кількості копій сигнальних пептидазних генів; 5) використання штамів, позбавлених протеаз, для попередження деградації позаклітинних ензимів [42].

Отже, синтез більшості  $\alpha$ -амілаз є процесом, що індукується в присутності крохмалю чи продуктів його гідролізу. Оптимізацією умов культивування штамів-продуцентів можна збільшити активність ензимів. Однак  $\alpha$ -амілази різного походження відрізняються за оптимальними параметрами культивування, а також за вибірковістю щодо джерел вуглецевого та азотного живлення.

### Виділення і очистка $\alpha$ -амілаз мікроорганізмів

Отримання високоактивних ензимних препаратів у гомогенному стані є дуже складним і трудомістким процесом, який включає низку етапів очищення. Це, перш за все, пов'язане зі здатністю більшості продуцентів синтезувати разом із необхідним продуктом інші ензими. Так, більшість амیلітичних продуцентів паралельно з  $\alpha$ -амілазою виділяють у культуральну рідину протеолітичні та (або) інші гліколітичні ензими, що значною мірою ускладнює їх очистку.

Для осадження протеїнів із культуральної рідини найчастіше застосовують сульфат амонію (*B. licheniformis*, *T. thalophilus* KSV 17, *Bacillus* sp. YX-1, *B. stearothermophilus* NCIM 2922, *B. cereus*, *B. subtilis* 147) [2, 12, 27, 32, 52, 63], хоча деякі дослідники віддають перевагу органічним розчинникам (етанолу, ацетону, ізопропанолу) (*Bacillus* sp. A3-15, *B. cereus*) [11, 64]. Найпоширенішими методами, які використовують для очистки ензимів, є гел- та іонообмінна хроматографія на різних носіях. Так,  $\alpha$ -амілазу з *A. niger* осаджували сульфатом амонію з подальшою очисткою гел-фільтрацією на колонці із Sephadex G-100 та іонообмінною хроматографією на колонці з DEAE Sepharose CL-6B. Це дало можливість очистити ензим у 15 разів [22].  $\alpha$ -Амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 [63] була очищена в 37 разів порівняно із супернатантом культуральної рідини із застосуванням методів гел-фільтрації та іонообмінної хроматографії на TSK HW-50 та DEAE TSK 650 M гелі (Toyo Soda, Японія), відповідно.

Комбінуванням методів ультрафільтрації, осадження сульфатом амонію та гел-фільтрації на колонці із Sepharose CL-6B позаклітинна  $\alpha$ -амілаза *B. subtilis* KIBGE HAS була очищена у 96 разів [19]. У той час як  $\alpha$ -амілаза *B. mojavensis* A21, одержана в гомогенному стані також комбінуванням ультрафільтрації, гел-фільтрації на Sephadex G-75 та аніонообмінної хроматографії на Sepharose mono Q, була очищена всього в 15,3 раза [3].

$\alpha$ -Амілазу *B. cohnii* US147 очищали ліофільним висушуванням супернатанту культуральної рідини, наступним діалізом проти буфера та подальшим нанесенням розчину ензиму на колонку із Sepharose CL-6B. Активні фракції з колонки зливали, ліофільно висушували, розчиняли у буфері та наносили на колонку з Biogel P100. Гомогенність ензиму підтверджували електрофорезом у системі ДСН [37]. Метод ліофілізації був використаний також для очищення  $\alpha$ -амілази *B. amyloliquefaciens* у комбінації із фракціонуванням сульфатом амонію та іонообмінною хроматографією. Внаслідок цього ензим був очищений у 38,5 раза [5]. Метод ліофільного висушування як початковий етап концентрування ензимів також був застосований для очищення  $\alpha$ -амілази з екстремального термофіла *G. thermoleovorans* [65] та  $\alpha$ -амілази із грибного продуцента *Trichoderma harzianum* [8].

Одним з найефективніших методів очистки, який дозволяє за одну стадію виділити

індивідуальні ензими зі складної суміші речовин, є афінна хроматографія. Цей метод заснований на біологічному спорідненні ензиму з нерозчинним лігандом. Метод афінної сорбції на крохмалі був застосований для очищення  $\alpha$ -амілази *Bacillus* sp. BKL20 [66], *Vibrio* sp. [47], *P. citrinum* HBF62 [25] та *B. subtilis* 147 [63].

В останні роки значного поширення здобув метод рідинної екстракції (liquid-liquid extraction), що є альтернативою багатостадійних методів очистки і який дозволяє за значно коротший період часу та за нижчу ціну у великих масштабах отримувати очищений продукт. Цей метод широко використовується в хімічній промисловості, однак для підвищення його продуктивності і безпечності використання необхідно розширити контроль за безперервністю процесу рідинної екстракції, а також досягти зниження рівня забруднення навколишнього середовища вже на початкових стадіях промислового виробництва [57].

#### Фізико-хімічні властивості $\alpha$ -амілаз

$\alpha$ -Амілази, виділені з різних джерел, виявляють різні фізико-хімічні властивості, зокрема вони можуть відрізнятися молекулярною масою, рН- та термооптимами, інгібіторами або активаторами їх дії (таблиця).

**Молекулярна маса  $\alpha$ -амілаз.** За даними літератури молекулярна маса (Мм)  $\alpha$ -амілаз різних мікробних продуцентів коливається від 10 до 210 кДа. Найнижче значення (10 кДа) виявлено у  $\alpha$ -амілази *B. caldolyticus*, а найвище (210 кДа) – у  $\alpha$ -амілази *Chloroflexus aurantiacus* [45]. З *B. macerans* було виділено  $\alpha$ -амілазу з Мм 139 кДа [26], із термофільної алкалофільної бактерії *Bacillus* sp. DM-15 – з Мм 126 кДа [70], а з гіпертермофільної археї *S. solfataricus* – із Мм 120 кДа [13]. Аналізом клонованих генів  $\alpha$ -амілаз та виведених амінокислотних послідовностей було показано, що Мм мікробних  $\alpha$ -амілаз переважно становить 50–60 кДа. Однак  $\alpha$ -амілази грибного походження зазвичай мають молекулярну масу від 41,5 до 76 кДа:  $\alpha$ -амілаза *P. janthinellum* – 42,7 кДа, *P. amagasakiense* – 63 кДа, *P. expansum* – 69 кДа [25].

$\alpha$ -Амілази більшості мікроорганізмів є мономерами, хоча існують винятки. Так,  $\alpha$ -амілаза із тропічної морської бактерії *B. amyloliquefaciens* ABBD за результатами денатуруючого і нативного електрофорезу виявилась гетеродимерним протеїном (97 кДа), який складається з двох субодиниць 45 і 55 кДа [71]. Крім того,  $\alpha$ -амілаза *B. subtilis* здатна існувати в мономерній формі з Мм 47–48,9 кДа. Ав-

тори показали [26], що  $\alpha$ -амілаза *B. subtilis* у разі високих концентрацій цинку може утворювати димери з Мм 96 кДа, які при рН нижче 5,0 розпадаються на складові мономери. Вони припустили, що контактною ділянкою зв'язування цинку в молекулі  $\alpha$ -амілази є імідазолне кільце гістидину, оскільки ензим втрачав здатність до димеризації під час фотоокислення в присутності метиленового синього.

Наявність вуглеводних компонентів у складі  $\alpha$ -амілаз *A. oryzae*, *Lypomyces kononenkoae*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* [45] може обумовлювати підвищені значення молекулярної маси. Вуглеводні складові більшості відомих  $\alpha$ -амілаз містять глюкозамін, який зв'яже вуглеводну і протеїнову частини молекули через амінну групу залишку аспарагіну. Вміст вуглеводів у більшості  $\alpha$ -амілаз становить 10%, за винятком  $\alpha$ -амілази *Schwanniomyces castelli*, яка містить близько 50% вуглеводів. Але каталітична функція  $\alpha$ -амілаз, як вважають [26], не пов'язана з наявністю в їхньому складі вуглеводного компонента.

**рН- і термооптимум, рН- і термо-стабільність  $\alpha$ -амілаз.** Властивості  $\alpha$ -амілаз, особливо їхня термо- і рН-стабільність, обумовлюють можливість їх подальшого застосування. У різних  $\alpha$ -амілаз рН-оптимум варіює від 3,0 до 12,0. Для більшості  $\alpha$ -амілаз, виділених з бактерій і грибів (*T. thalophilus* KSV 17, *P. citrinum* HBF62, *A. oryzae*, *T. fusca*, *A. niger*, *A. flavus* var. *oryzae*) [1, 22, 25, 31, 32, 48, 63], оптимальний рівень рН знаходиться в слабо кислій та нейтральній області. Хоча деякі  $\alpha$ -амілази (*B. cohnii* US147, *A. niger* JGI 24) виявляють активність за лужних [21, 37] та екстремальних (3,0–4,5) значень рН. Так,  $\alpha$ -амілаза *Alicyclobacillus acidocaldarius* виявляє максимальну активність за рН 3,0 [72], *B. acidocaldarius* – за рН 3,5 [45], *L. kononenkoae* – за рН 4,5 [45]. Для  $\alpha$ -амілази *Bacillus* sp. PN5 оптимальним є рН 10,0 [30].  $\alpha$ -Амілаза *Bacillus* GM8901 виявляла активність у широкому діапазоні рН від 5,0 до 12,0 з рН-оптимумом 11,0–12,0 [73].  $\alpha$ -Амілаза *Bacillus* sp. A3-15 була активною в лужній області рН від 10,0 до 11,5 з оптимумом рН за 11,0 [11].  $\alpha$ -Амілази, активні за лужних значень рН, привертають до себе увагу, оскільки широко застосовуються у виробництві мийних засобів.

Перспективним також є пошук продуцентів  $\alpha$ -амілаз, активних і стабільних у кислій області рН. Ці ензими можуть застосовуватися у промисловості на етапі розрідження крохмалю з метою виключення стадії регулювання рівня рН крохмального розчину.

Фізико-хімічні властивості  $\alpha$ -амілаз деяких мікроорганізмів

| Джерело виділення                   | Молекулярна маса, кДа | pH-оптимум | Термо-оптимум, °C | Інгібітор  | Активатор  |
|-------------------------------------|-----------------------|------------|-------------------|--|--|
| <i>A. niger</i> [22]                | 61,0                  | 5,0        | 50                | Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>   | Fe <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>  |
| <i>A. niger</i> JGI 24 [21]         | 43,0                  | 9,5        | 30                | Mg <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup>   | Ca <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>  |
| <i>A. oryzae</i> [48]               | 68,0                  | 5,0        | 50                | Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>   | Mn <sup>2+</sup>   |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> [5]     | 58,0                  | 5,0–8,0    | 50–60             | K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , EDTA, SDS, сечовина                                    | Ca <sup>2+</sup>   |
| <i>B. cohnii</i> US147 [37]         | 30,0                  | 9,0        | 70                | EDTA, Zn <sup>2+</sup> , SDS, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , NaBO <sub>3</sub>  | Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>  |
| <i>B. megaterium</i> [58]           | 63,0                  | 5,0–13,0   | 32–50             | EDTA, SDS  | Na <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>  |
| <i>B. mojavensis</i> A21 [3]        | 58,0                  | 6,5        | 80                | Hg <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , EDTA, SDS  | Mg <sup>2+</sup>   |
| <i>Bacillus</i> sp. GRE1 [67]       | 55,0                  | 5,5–6,0    | 65–70             | Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup>   | Н. д.  |
| <i>Bacillus</i> sp. HUTBS62 [4]     | 54,2                  | 4,4        | 90                | Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>   | Co <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>                    |
| <i>B. subtilis</i> BS5 [68]         | 63,0                  | 6,0        | 50                | EDTA, HgCl <sub>2</sub>  | Na <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>  |
| <i>G. thermoleovorans</i> [65]      | 26,0                  | 8,0        | 100               | Hg <sup>2+</sup> , Sn <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , EDTA, Triton X-100, SDS, PMSF   | Fe <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Tween 20   |
| <i>P. camemberti</i> PL21 [69]      | 60,5                  | 6,0        | 30                | Ag <sup>+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>  | Ca <sup>2+</sup>   |
| <i>T. thalpopphilus</i> KSV 17 [32] | 52,0                  | 7,0        | 85–90             | Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , NBS,   | Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup>  |
| <i>T. fusca</i> [31]                | 64,0                  | 7,0        | 60                | Hg <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup>   | Cu <sup>2+</sup>   |
| <i>T. harzianum</i> [8]             | 70,0                  | 4,5        | 40                | Co <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , EDTA  | Ca <sup>2+</sup>   |
| <i>Vibrio</i> sp. [47]              | 52,48                 | 6,5        | 60                | EDTA, EGTA, Hg <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup>  | Fe <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> |
| <i>Wangia</i> sp. C52 [20]          | 58,0                  | 6,0        | 30                | EDTA, EGTA, SDS, Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Al <sup>3+</sup> | Ca <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>  |

Примітки: PMSF – фенілметилсульфонілфторид, NBS – N-бромосукцинімід, СМС – 1-циклогексил-3-(2-морфолініл-4-етил) карбодіімід метил *p*-толуенсульфонат, EDTA – етилендіамінтетраацетат, EGTA – етиленглікольтетраацетат, SDS – додецилсульфат натрію. Н. д. – не досліджено

Відомо, що більшість ензимних препаратів, що використовуються в процесах конверсії крохмалю, мають оптимум рН близько 6,5, тому виникає необхідність у штучному підвищенні природного рівня рН крохмального розчину з 4,5 до 5,8–6,2. А використання ацидофільних  $\alpha$ -амілаз значно спростило б промисловий процес переробки крохмалю.

Таким чином, показано, що мікробні  $\alpha$ -амілази є активними в широкому діапазоні рН, хоча зустрічаються ензими, які виявляють активність у вузькій області рН (*Bacillus* sp. HUTBS62, *T. harzianum*) [4, 8].

Активність  $\alpha$ -амілаз пов'язана з температурними умовами росту мікроорганізмів, хоча частіше максимум активності ензиму спостерігається за температури, вищої від оптимальних умов їх вирощування. Так,  $\alpha$ -амілаза *B. subtilis* KIBGE HAS виявляла максимальну активність при 50 °С, у той час як температура вирощування мікроорганізму становить 35 °С [74], найвища активність  $\alpha$ -амілази *B. stearothermophilus* NCIM 2922 була за 80 °С, тоді як оптимальна температура росту продуценту – 50 °С [12]. Культивування *G. thermoleovorans* здійснювали при 70 °С, а максимальна активність синтезованої ним  $\alpha$ -амілази виявлялася при 100 °С [65]. Подібне явище спостерігалось і у разі з  $\alpha$ -амілазою *A. niger*, температурний оптимум якої становив 50 °С при вирощуванні культури при 27 °С [22].

Температурний оптимум активності більшості  $\alpha$ -амілаз знаходиться переважно в межах 40–60 °С [2, 5, 22, 63, 68]: так,  $\alpha$ -амілаза *Bacillus* sp. YX-1 виявляє максимальну активність за температури 40–50 °С [27],  $\alpha$ -амілаза *Vibrio* sp. – за 60 °С [47]. Найнижчий температурний оптимум становить 25–30 °С для  $\alpha$ -амілази *F. oxysporum* [45], а найвищий – 135 °С характерний для  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* [75]. Крім того, серед  $\alpha$ -амілаз зустрічається велика кількість термостабільних ензимів, які виявляють активність при 65 °С (*B. licheniformis*) [2], 70 °С (*B. cohnii* US147, *B. subtilis*, *Nocardioopsis* sp.) [10, 29, 37], 80 °С (*A. flavus*, *B. stearothermophilus* NCIM 2922) [12, 23], 90 °С (*Bacillus* sp. PN5, *T. thalophilus* KSV 17, *Bacillus* sp. HUTBS62, *B. subtilis* 147) [4, 30, 32, 63] і навіть 100 °С (*G. thermoleovorans*) [65].

Температурний оптимум  $\alpha$ -амілаз може залежати від наявності в реакційному середовищі  $\text{Ca}^{2+}$ , як це спостерігається у разі з  $\alpha$ -амілазою *T. thalophilus* KSV 17: у присутності 10 мМ  $\text{CaCl}_2$  оптимум дії ензиму виявлявся за температури 90 °С, а за його відсутності – 85 °С

[32]. Здатність  $\alpha$ -амілаз виявляти активність за високих значень температури може бути обумовлена наявністю гідрофобних амінокислот у структурі ензиму, а також присутністю вуглеводного компонента.

За вивчення впливу температури на активність різних  $\alpha$ -амілаз, було показано, що вони виявляють активність як у широкому (*Bacillus* sp. HUTBS62, *T. thalophilus* KSV 17, *A. niger* JGI 24, *G. thermoleovorans*, *A. niger*, *B. subtilis* 147) [4, 10, 21, 22, 32, 63, 65], так і у вузькому діапазоні температури (*Bacillus* sp.) [76].

Термостабільність є бажаною характеристикою більшості біотехнологічних процесів, тому термофільні мікроорганізми становлять особливий інтерес, як потенційне джерело нових термостабільних ензимів. Існує декілька основних причин використання саме термостабільних ензимів у промислових процесах конверсії крохмалю. По-перше, температура за розщеплення крохмалю має бути 50 °С і вище для зменшення в'язкості крохмального клейстеру та запобігання процесам потемніння розчину. По-друге, застосування термостабільних  $\alpha$ -амілаз надає багато переваг, таких як зниження ризику контамінації сторонньою мікрофлорою, підвищення швидкості дифузії внаслідок зниження в'язкості крохмального розчину, скорочення витрат на охолодження обладнання [10–12]. Для промислового виробництва термостабільних ензимів широко використовуються бактерії, що належать до роду *Bacillus*, а саме *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* та ін. [5, 7]. Отже, різноманіття властивостей  $\alpha$ -амілаз робить їх перспективними об'єктами для застосування в різних галузях промисловості.

### Субстратна специфічність $\alpha$ -амілаз

$\alpha$ -Амілази виявляють специфічність до різних субстратів залежно від походження ензиму, а також від структури субстрату. Зокрема, вони здатні гідролізувати розчинний крохмаль, амілозу, амілопектин, глікоген, мальтодекстрини,  $\alpha$ - і  $\beta$ -циклодекстрини тощо. Дослідження дії  $\alpha$ -амілаз на різні субстрати, показало, що вони виявляють більшу спорідненість до лінійних олігосахаридів із великою кількістю глюкозних одиниць. Цей факт можна пояснити механізмом дії ензиму, який був запропонований L. Kandra [77], відповідно до якого  $\alpha$ -амілаза *B. licheniformis* містить у своїй структурі один каталітичний сайт та вісім субсайтів зв'язування субстрату. Завдя-

ки такій будові ензиму, довголанцюгові молекули вуглеводів здатні одночасно взаємодіяти з декількома центрами зв'язування в його молекулі, утворюючи стійкий ензим-субстратний комплекс та знижуючи, таким чином, енергію розриву глікозидних зв'язків. Окрім довжини вуглеводного ланцюга, на швидкість гідролізу субстрату також впливає і кількісний вміст в ньому  $\alpha$ -1,4- і  $\alpha$ -1,6-глікозидних зв'язків. Оскільки відомо, що похідні амілози здатні підвищувати активність  $\alpha$ -амілаз, то субстрати з переважаючим вмістом  $\alpha$ -1,4-глікозидних зв'язків будуть розщеплюватися набагато швидше, ніж ті, що містять більше  $\alpha$ -1,6-глікозидних зв'язків, які, в свою чергу, гальмують активність  $\alpha$ -амілаз. Так,  $\alpha$ -амілаза *T. harzianum* [8] по відношенню до розчинного картопляного крохмалю (прийнято за 100%) гідролізувала амілопектин, глікоген,  $\beta$ -декстрин і  $\alpha$ -декстрин зі швидкістю 450, 274, 28 і 4% відповідно. Ці дані підтверджують, що ензим має найвищу афінність щодо високомолекулярних субстратів (крохмалю, амілопектину та глікогену), які містять  $\alpha$ -1,4- і  $\alpha$ -1,6-глікозидні зв'язки.

$\alpha$ -Амілаза *P. citrinum* HBF62 виявляла широку субстратну специфічність зі здатністю гідролізувати як  $\alpha$ -1,4-, так і  $\alpha$ -1,6-глікозидні зв'язки. Гідроліз розгалужених вуглеводів, таких як крохмаль (рисовий, пшеничний, картопляний), амілопектин і глікоген, був ефективнішим, ніж мальтотріози і нерозгалуженої амілози [25]. А  $\alpha$ -амілаза *B. tajavensis* A21, навпаки, найефективніше розщеплювала амілозу і взагалі не впливала на мальтогексозу, мальтопентозу та мальтотетрозу [3].

Оскільки  $\alpha$ -амілази є простими протеїнами, їхні кінетичні характеристики описуються згідно з кінетикою Міхаеліса–Ментен [78]. Значення  $K_m$  і  $V_{max}$  різних ензимів відрізняються між собою в залежності від субстрату, що використовується, а також від умов реакції. Низькі значення  $K_m$  вказують на високу спорідненість ензиму до субстрату [23]. Так, величина  $K_m$  у разі розщеплення розчинного крохмалю *B. licheniformis* [2] становила 8,3 мг/мл. Величина  $K_m$   $\alpha$ -амілази *B. subtilis* BS5 за розщеплення розчинного крохмалю становила 16,67 [68],  $\alpha$ -амілази *T. thalophilus* KSV 17 – 5,2 [32],  $\alpha$ -амілази *Bacillus* sp. GRE1 – 4,98 [67],  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* KCX 006 – 0,291 [79],  $\alpha$ -амілази *B. amyloliquefaciens* – 3,076 [23],  $\alpha$ -амілази *G. thermoleovorans* – 1,11 [65]. Отже, найвищий рівень спорідненості до розчинного крохмалю характерний для  $\alpha$ -амілази *B. subtilis*

KCX 006, оскільки вона має найнижче значення  $K_m$  – 0,291. Спрямованим мутагенезом можна досягнути підвищення рівня спорідненості ензиму до субстрату, як це було зроблено на прикладі  $\alpha$ -амілази *B. licheniformis* [80].

$\alpha$ -Амілази деяких продуцентів здатні розщеплювати нативний (нежелатинізований) крохмаль [5, 27, 67, 71]. Так,  $\alpha$ -амілаза *Microbacterium aurum* B8.A розщеплювала пшеничний, тапіоковий та картопляний крохмаль за температури 37 °С, яка є значно нижчою від температури їх желатинізації. Встановлено, що гранули картопляного крохмалю деградувалися  $\alpha$ -амілазою повільніше, ніж гранули двох інших видів крохмалю, що, можливо пов'язано зі структурними відмінностями їх, а також впливом площі поверхні субстратів [81].

$\alpha$ -Амілаза *Bacillus* sp. YX-1 за вісім годин гідролізувала відповідно 57,5; 53,0 і 45,1% кукурудзяного, пшеничного і картопляного крохмалю до 100% їх вихідної концентрації. Підвищення концентрації кукурудзяного крохмалю до 14% не приводило до зростання швидкості гідролізу субстрату цим ензимом, що є дуже важливим у процесах прямого розщеплення нативного кукурудзяного крохмалю в харчовій та спиртовій промисловості [27]. А  $\alpha$ -амілаза *B. licheniformis* ATCC 9945a за чотири години гідролізувала 1%-ні розчини тритікалевого, пшеничного, картопляного та кукурудзяного крохмалю зі швидкістю 63, 60, 59 і 37% відповідно [82].

Таким чином, більшість  $\alpha$ -амілаз характеризуються широкою субстратною специфічністю зі здатністю до розщеплення як лінійних, так і розгалужених субстратів. Порівняння  $K_m$   $\alpha$ -амілаз, виділених із різних джерел, свідчить про відмінності в їх спорідненості до розчинного крохмалю.

### Доменна структура $\alpha$ -амілаз

*Особливості доменної структури  $\alpha$ -амілаз.* Характерною особливістю представників родини  $\alpha$ -амілаз є використання ними механізму зі збереженням  $\alpha$ -аномерної конфігурації субстрату в процесі реакції, хоча вони широко відрізняються між собою за субстратною специфічністю та продуктами реакції. Цю різницю пов'язують із наявністю різних доменів у каталітичному центрі та вуглеводзв'язувальних субсайтах навколо каталітичного центру [83]. Встановлено, що будь-які незначні зміни в первинній структурі глікозил-гідролаз призводять до зміни їхньої субстратної специфічності. Більшість глікозил-гідролаз характеризується складною доменною



структурою, а різні домени одного ензиму часто мають незалежну еволюційну історію. Крім того, один протеїн містить одночасно два і більше гомологічних чи негомологічних домени [84].

$\alpha$ -Амілази належать до GH-13 родини [9, 71], характерною особливістю якої є наявність каталітичного домену А у вигляді  $(\beta/\alpha)_8$ -циліндра. Домен із просторовою структурою такого типу вперше було виявлено в м'язах курчат у структурі тріозофосфатізомерази, тому його ще називають ТІМ-циліндром [78, 83, 84]. Вважають, що всі домени з цим типом структури виникли шляхом дуплікації гену, що кодує  $(\beta/\alpha)_4$ -структуру, або шляхом двох послідовних дуплікацій гену, що кодує  $(\beta/\alpha)_2$ -структуру [84]. Домен у вигляді  $(\beta/\alpha)_8$ -циліндра зустрічається не лише в представників родини  $\alpha$ -амілаз, але і серед інших ензимів [83].

Домен А – найконсервативніший домен, що складається з восьми паралельно розташованих  $\beta$ -ланцюгів, які утворюють ядро циліндра та оточені вісьмома  $\alpha$ -спіралями [61, 83, 85]. Ділянки поліпептидного ланцюга в  $(\beta/\alpha)_8$ -циліндрі, що з'єднують  $\beta$ -ланцюги з  $\alpha$ -спіралями, називають петлями. Висококонсервативні амінокислотні залишки, що відповідають за каталіз та зв'язування субстрату, локалізовані в петлях на С-кінці  $\beta$ -ланцюгів цього домену [83].

Крім домену А, в структурі більшості  $\alpha$ -амілаз, у тому числі *A. oryzae*, *A. niger*, *Pseudomonas stutzeri*, *B. licheniformis* [86, 87] можна виділити ще два домени: В і С, які розташовані із протилежних боків  $(\beta/\alpha)_8$ -циліндра. Домен В формується як вигин у вигляді довгої петлі між третім  $\beta$ -ланцюгом та третьою  $\alpha$ -спіраллю  $(\beta/\alpha)_8$ -циліндра [14, 15, 57, 61]. Для нього характерна найбільша варіативність розміру та структури серед різних  $\alpha$ -амілаз [14, 19, 78]. Зазвичай домен В займає положення від 44 до 133 амінокислотного залишку [83], хоча в  $\alpha$ -амілази *A. haloplanctis* він розташовується від 87 до 146 амінокислотного залишку [88]. Цей домен відіграє важливу роль у зв'язуванні  $\text{Ca}^{2+}$  та субстрату. Крім того, він формує більшу частину субстратзв'язувальної щілини і, як вважають [14, 83], відповідає за субстратну специфічність ензиму.

Домен С охоплює С-термінальну частину амінокислотної послідовності ензиму і зв'язаний з доменом А. Він має структуру  $\beta$ -листка, що утворений вісьмома  $\beta$ -ланцюгами (кількість  $\beta$ -ланцюгів може варіювати від 5 – в амілазах злакових до 10 – в слинній амілазі людини), і набуває вигляду  $\beta$ -сендвіча [19, 26,

57, 85, 88]. Домен С може захищати гідрофобні залишки каталітичного домену А від згубної дії розчинників, тим самим стабілізуючи його структуру [85, 89]. У циклодекстрин-глікозилтрансферази домен С містить сайт зв'язування мальтози, який відповідає за зв'язування нативного крохмалю. У мальтогенних  $\alpha$ -амілазах за доменом С розташований домен D, функцію якого на сьогодні не встановлено [83]. Крім того, в представників родини GH-13 також ідентифіковані домен E, який відповідає за взаємодію із субстратом, і N-термінальні F-, H-, G-домени, що виявлені в ензимів, які гідролізують  $\alpha$ -1,6-глікозидні зв'язки в розгалужених субстратах [83].

Так, нещодавні дослідження кристалічної структури термостабільної  $\alpha$ -амілази *Halothermothrix orenii* (Аму В) показали [34, 90], що окрім типової доменної організації, характерної для родини GH-13, Аму В містить додатковий N-кінцевий домен (домен N), який формує довгу боріздку (N-С боріздка) приблизно 3 нм від активного центру. За результатами вивчення структури та біохімічної характеристики Аму В було встановлено, що домен N підвищує ступінь зв'язування ензиму з нативним крохмалем. Шляхом теоретичного моделювання було доведено, що N-С боріздка здатна просторово вміщувати високомолекулярні субстрати, такі як крохмаль. У порівнянні з іншими  $\alpha$ -амілазами, які гідролізують лише  $\alpha$ -1,4-глікозидні зв'язки, мальтогенні  $\alpha$ -амілази здатні розщеплювати також і  $\alpha$ -1,6-глікозидні зв'язки. Було висловлено припущення, що каталітичні властивості мальтогенних  $\alpha$ -амілаз пов'язані із присутністю додаткових 130 амінокислотних залишків на N-кінці, яких не виявлено в типових  $\alpha$ -амілаз [46].

Активний центр  $\alpha$ -амілаз розташований у довгій щілині  $(\beta/\alpha)_8$ -циліндра, що знаходиться на поверхні між С-кінцями А- і В-домену [57, 61]. Каталітичний домен містить чотири високо консервативні області послідовностей, які тісно пов'язані з активним центром  $\alpha$ -амілаз. Вони розміщені біля С-термінальних кінців  $\beta$ -ланцюгів ( $\beta_3$ ,  $\beta_4$ ,  $\beta_5$  і  $\beta_7$ ) каталітичного  $(\beta/\alpha)_8$ -циліндра та несуть найбільш функціонально важливі залишки, включаючи каталітичну тріаду [61]. Пізніше було ідентифіковано ще три додаткові консервативні області послідовностей, які розташовані біля С-кінця домену В та  $\beta$ -ланцюгів  $\beta_2$  і  $\beta_8$  каталітичного  $(\beta/\alpha)_8$ -циліндра та містять амінокислотні залишки, що визначають певну специфічність ензиму [61, 83].

Каталітичний домен  $\alpha$ -амілаз містить активний центр, який складається з

каталітичного центру та багатьох субсайтів, кожний з яких взаємодіє з відповідною глюкозною одиницею субстрату. Згідно з номенклатурою Davies зі співавт. [91] субсайти в напрямку нередукуючого кінця позначаються негативними порядковими номерами (від  $-1$  до  $-n$ ), в той час як субсайти в напрямку редукуючого кінця – позитивними номерами (від  $+1$  до  $+n$ ) (рис. 1). Каталітичний центр, в якому відбувається розщеплення глікозидного зв'язку, розташовано між субсайтами  $-1$  та  $+1$ . Кількість субсайтів зліва від каталітичного центру становить  $2-3$ , а справа – варіює від  $2$  до  $7$  [92]. Існує два шляхи взаємодії субсайтів з мономерними одиницями субстрату: продуктивний і непродуктивний. У разі непродуктивного зв'язування субстрату відповідний глікозидний зв'язок не досягає амінокислот каталітичного центру, тоді як у разі продуктивного зв'язування глікозидний зв'язок субстрату розташовується над каталітичним центром ензиму, який його розщеплює [78].

**Некаталітичні домени зв'язування  $\alpha$ -амілаз.** Більшість  $\alpha$ -амілаз є мультидоменими протеїнами, які, крім каталітичного домену, містять один чи декілька некаталітичних доменів. Для представників родини  $\alpha$ -амілаз характерним є наявність так званого домену зв'язування нативного крохмалю (starch-binding domain, SBD), який відповідає за зв'язування та травлення (розщеплення) нативного гранулярного крохмалю, а також концентрування субстрату в активному центрі ензиму [89, 93]. Він може розпушувати поверхню крохмалю, прискорюючи таким чином швидкість його гідролізу [78, 93]. Крім того, домен SBD  $\alpha$ -амілаз може обумовлювати термостабільність ензиму [34, 35], однак це не стосується термостабільності глюкоамілаз [85]. Крім домену зв'язування крохмалю, глікозидні гідролази мають центри зв'язування інших вуглеводів [78].

Домен зв'язування нативного крохмалю виявляється лише у  $10\%$   $\alpha$ -,  $\beta$ - та глюкоамілаз [35, 85, 89]. Він присутній в усіх циклодекстринглюканотрансферазах, мальтогенних  $\alpha$ -амілазах, у деяких  $\alpha$ -амілазах актиноміцетів [33], грибів [27], дріжджів [34, 35] та бактерій [5, 27, 71]. Домен SBD розташовується з С-термінальної частини  $\alpha$ -амілаз [85], включення становить глюкоамілаза *A. oryzae* [78, 85] та  $\alpha$ -амілаза *Thermoactinomyces vulgaris* [33], у яких SBD локалізується на N-кінці протеїнової молекули.

Домен зв'язування нативного крохмалю зазвичай сформований  $100$  амінокислотними

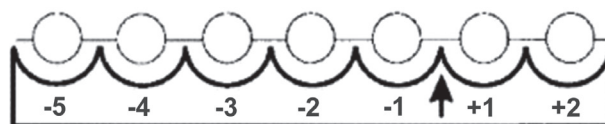


Рис. 1. Активні субсайти відповідно до номенклатури глікозил-гідролаз за Davies зі співавт. [91]

залишками, які утворюють декілька сегментів  $\beta$ -ланцюгів, що створюють деформовану  $\beta$ -циліндричну структуру [85, 89]. Однак, домен SBD *Lactobacillus* сформований з  $500$  амінокислотних залишків, які організовані в тандемі повторень (RUs) з  $91$  амінокислотою кожен [89, 94]. Кількість повторів може відрізнятися у представників різних видів. Так,  $\alpha$ -амілаза *L. manihotivorans* і *L. plantarum* має  $4$  повтори,  $\alpha$ -амілаза *L. amylovorus* –  $5$  повторів. Схожу організацію виявлено в  $\alpha$ -амілазі *Bacillus* sp. no. 195, яка містить  $2$  повтори, що утворюють SBD, та мальтопентозо-продукувальної  $\alpha$ -амілази алкалофільної грамположитивної бактерії із трьома С-термінальними повторами, функцію яких не встановлено [89, 94]. Між тандемами повторень в  $\alpha$ -амілазі *L. manihotivorans* і *L. plantarum* знаходяться вставні ділянки, які складаються з  $48$  нуклеотидів та містять велику кількість залишків серину та треоніну. Послідовність цих ділянок подібна до багатого на серин та треонін О-глікозилюваного Gr-I домену глюкоамілази I *A. niger*, функція якого полягає в збереженні структури протеїнової молекули під час стресу, адсорбції на гранулах нативного крохмалю та секреції [89, 95].

**Іони металів у структурі  $\alpha$ -амілаз.** Більшість  $\alpha$ -амілаз містять у своєму складі  $\text{Ca}^{2+}$ , який знаходиться на поверхні між доменами А і В [82, 92], та відіграє важливу роль у стабільності і активності ензиму. Крім того, наявність іонів кальцію обумовлює стабільність  $\alpha$ -амілаз до високих температур [5, 14], сприяє захисту ензиму від денатурації під впливом високих концентрацій сечовини [26] та забезпечує стійкість  $\alpha$ -амілаз до протеолітичної деградації [26]. Видалення  $\text{Ca}^{2+}$  діалізом або додаванням металозв'язувальних агентів (ЕДТА, ЕГТА) призводить до повної або часткової втрати активності ензиму, яку можна відновити додатковим введенням  $\text{Ca}^{2+}$  [14, 26].

$\alpha$ -Амілази різного походження містять неоднакову кількість кальцію. Так, для проявлення активності  $\alpha$ -амілазі слини людини необхідний  $1$  атом кальцію на молекулу, бактеріальній –  $4$  або більше, грибною –  $10$

[14, 26]. Цю потребу в іонах кальцію можна пояснити його здатністю надавати молекулі ензиму структурну жорсткість, яка необхідна для ефективної біологічної активності, шляхом формування щільної, внутрішньо-молекулярної, металохелатної структури, що виконує роль, подібну до ролі дисульфідних містків [26]. Відомо, що останні відсутні в структурі бактеріальних  $\alpha$ -амілаз, однак виявляються в  $\alpha$ -амілазах ссавців [14].

Стабілізуючий вплив кальцію на термостабільність ензиму можна пояснити зв'язуванням  $\text{Ca}^{2+}$  з карбоксильними групами гідрофобних амінокислот протеїну, який внаслідок цього набуває компактною структури. Так, у молекулі  $\alpha$ -амілази *B. licheniformis*, окрім основного центру зв'язування кальцію (Ca I), який локалізований на поверхні між доменами A і B, існує кілька додаткових (Ca II і Ca III). Ca II центр розташований біля першого (Ca I), і у присутності  $\text{Na}^+$  вони формують тріаду Ca-Na-Ca, яка розміщується на поверхні доменів A і B [14, 86, 87]. Тріада металів є дуже важливою для підтримання структури протеїну в правильній конформації і для протидії температурній інактивації ензиму [14, 86, 87, 96]. Ca III центр зв'язування локалізується на поверхні між доменами A і C, функціонуючи як місток між ними.

У 2001 році було виявлено  $\alpha$ -амілазу *Bacillus* (Amy K38), яка замість  $\text{Ca}^{2+}$  містить у своєму складі два  $\text{Na}^+$ , що забезпечують збереження її структури та функцій [96]. Окрім цього, існують кальційнезалежні ензими, які не потребують  $\text{Ca}^{2+}$  для прояву своєї активності (*B. thermoleovorans* NP54, *Bacillus* sp. KR8104) [86, 97].

В активному центрі  $\alpha$ -амілази психрофільних бактерій *A. haloplanctis* і *Pseudoalteromonas haloplanktis* міститься  $\text{Cl}^-$ , який відповідає за підвищену каталітичну активність ензиму [14, 92]. Зазвичай  $\text{Cl}^-$  виявляються у структурі  $\alpha$ -амілаз ссавців [14]. Особливістю цих хлорвмісних  $\alpha$ -амілаз є наявність на поверхні ензиму між доменами A і C тріади Glu-His-Ser, характерної для серинових протеїназ [14, 92].

Отже, характерною особливістю  $\alpha$ -амілаз є наявність каталітичного домену A у вигляді  $(\beta/\alpha)_8$ -циліндра. Важливу роль у підтриманні активності і стабільності більшості  $\alpha$ -амілаз відіграють  $\text{Ca}^{2+}$ , які взаємодіють із карбоксильними групами гідрофобних амінокислот і забезпечують формування жорсткої структури протеїнової молекули, захищаючи її, таким чином, від згубної дії високих температур.

## Механізм каталітичної дії $\alpha$ -амілаз

Загальноприйнятий каталітичний механізм дії  $\alpha$ -амілаз полягає у збереженні  $\alpha$ -аномерної конфігурації субстрату під час гідролізу шляхом подвійного обертання, який був запропонований Koshland [98].  $\alpha$ -Глікозидний зв'язок, що розщеплюється під час реакції, є дуже стабільним, швидкість його спонтанного гідролізу за кімнатної температури дуже низька [83, 99]. У механізм розщеплення глікозидного зв'язку залучені два каталітичні залишки в активному центрі – це залишок глутамінової кислоти як електрофіл (Glu 261) та залишок аспартату як нуклеофіл (Asp 231). Цей механізм складається з 5 етапів:

I. Відбувається зв'язування субстрату в активному центрі, після чого залишок глутамінової кислоти віддає протон кисню глікозидного зв'язку між двома молекулами глюкози в субсайтах -1 і +1, а нуклеофільний аспартат атакує положення C1 глюкози в субсайті -1.

II. Формується перехідний стан іоноподібного оксокарбонію з наступним утворенням ковалентного інтермедіату [100].

III. Протонована молекула глюкози в субсайті +1 залишає активний центр, а молекула води переміщується в активний центр та атакує ковалентний зв'язок між молекулою глюкози в субсайті -1 і аспартатом.

IV. Знову формується перехідний стан іоноподібного оксокарбонію.

V. Глутамат акцептує протон від молекули води, яка надійшла в активний центр ензиму, а кисень з цієї молекули води заміщає зв'язок оксокарбонію між молекулою глюкози в субсайті -1 і аспартатом, утворюючи нову гідроксильну групу в C1 положенні глюкози в субсайті -1 [83].

Крім зазначених вище амінокислотних залишків, які беруть безпосередню участь у розщепленні глікозидного зв'язку, важливу роль в цьому процесі відіграють також залишки гістидину, аргініну і тирозину. Вони забезпечують правильне розташування субстрату в активному центрі, необхідну орієнтацію нуклеофіла, стабілізацію проміжних сполук, а також поляризацію електронної структури субстрату [36]. Основні етапи каталітичної дії  $\alpha$ -амілаз наведено на рис. 2.

Отже, завдяки тому, що  $\alpha$ -амілази є позаклітинними ензимами, які характеризуються різноманітними, часто навіть унікальними, фізико-хімічними властивостями, широкою субстратною специфічністю, вони є перспективними для застосування

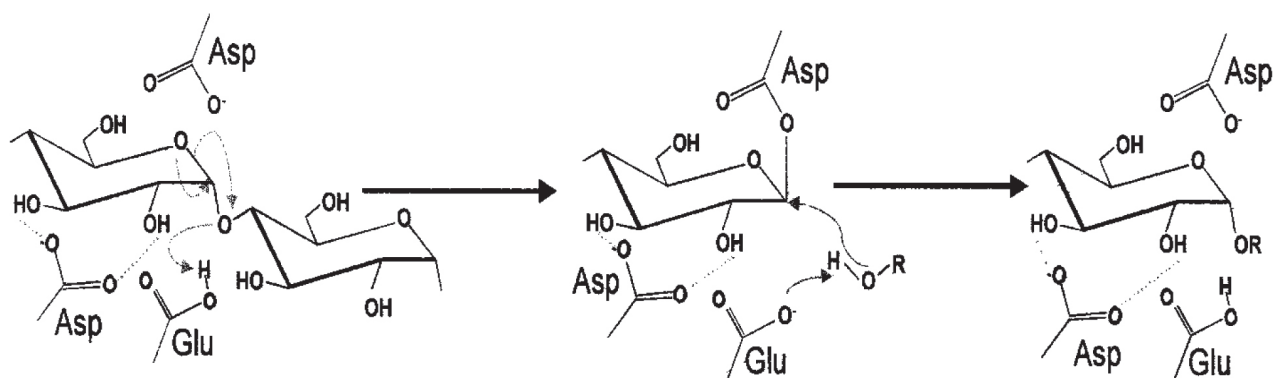


Рис. 2. Основні етапи каталітичної дії  $\alpha$ -амілаз [36]

в різних галузях промисловості. Здатність  $\alpha$ -амілаз зберігати активність і стабільність за високих температур забезпечує зниження витрат на одержання кінцевого продукту, а ензими, активні за кислих і лужних значень рН, інтенсивно застосовуються на одній із стадій розварювання крохмалю та у виробництві мийних засобів. Відомо, що амілолітичні ензими займають 30% від світового виробництва всіх ензимних препаратів, спектр використання яких розширюється з кожним роком. Але, на жаль, в Україні виробляється обмежена кількість  $\alpha$ -амілаз, що не може задовольнити зростаючі потреби вітчизняного виробництва. Тому пошук нових продуцентів  $\alpha$ -амілаз з покращеними властивостями залишається актуальним питанням сьогодення.

### МИКРОБНЫЕ $\alpha$ -АМИЛАЗЫ: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ДОМЕННАЯ СТРУКТУРА

*Е. В. Авдюк, Л. Д. Варбанец*

Институт микробиологии и вирусологии  
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев;  
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

В обзоре приведены современные данные литературы и результаты собственных исследований о продуцентах, физико-химических свойствах и субстратной специфичности  $\alpha$ -амілаз, которые продуцируются микроорганизмами разных таксономических групп: бактериями, грибами и дрожжами. Синтез большинства  $\alpha$ -амілаз является индуцибельным процессом, который стимулируется присутствием крахмала или продуктов его гидролиза. Оптимизацией условий культивирования штаммов-продуцентов можно достичь повышения уровня активности энзимов.  $\alpha$ -Амілазы,

выделенные из разных источников, отличаются своими физико-химическими свойствами, в частности молекулярной массой, рН- и термооптимами, ингибиторами или активаторами. Они способны гидролизовать  $\alpha$ -1,4- и в некоторых случаях  $\alpha$ -1,6-связанные остатки глюкозы в растворимом крахмале, амилозе, амилопектине, гликогене, мальтодекстринах,  $\alpha$ - и  $\beta$ -циклодекстринах и других углеводных субстратах.  $\alpha$ -Амілазы относятся к GH-13 семейству гликозил-гидролаз, характерной особенностью которых является наличие каталитического домена А в виде  $(\beta/\alpha)_8$ -цилиндра. Кроме домена А, в структуре  $\alpha$ -амілаз присутствуют еще два домена: В и С, которые расположены приблизительно на противоположных сторонах  $(\beta/\alpha)_8$ -цилиндра. Большинство известных  $\alpha$ -амілаз содержат в своем составе ион кальция, который находится на поверхности между доменами А и В и играет важную роль в стабильности и активности энзима.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -амілаза, физико-химические свойства, субстратная специфичность, доменная структура.

### MICROBIAL $\alpha$ -AMYLASES: PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES, SUBSTRATE SPECIFICITY AND DOMAIN STRUCTURE

*K. V. Avdiyuk, L. D. Varbanets*

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,  
National Academy of Sciences of Ukraine;  
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

The current literature data on producers, physico-chemical properties and substrate specificity of  $\alpha$ -амілаз produced by microbes from different taxonomic groups such as bacteria, fungi and yeasts are discussed in the survey. Synthesis of

$\alpha$ -amylase majority is an inducible process which is stimulated in the presence of starch or products of its hydrolysis. It is possible to increase enzymes activity level by optimization of cultivation conditions of strains-producers.  $\alpha$ -Amylases, isolated from different sources are distinguished in their physico-chemical properties, particularly in their molecular weights, pH- and thermooptimums, inhibitors and activators. The enzymes hydrolyse soluble starch, amylose, amylopectin, glycogen, maltodextrins,  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrins and other carbohydrate substrates. It is well known that  $\alpha$ -amylases belong to GH-13 family of glycosyl-hydrolases, which contain the catalytic domain A as  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel. In addition to domain A,  $\alpha$ -amylases contain two other domains: B and C, which are localized approximately on opposite sides of  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel. Most of the known  $\alpha$ -amylases contain calcium ion, which is located on the surface between domains A and B and plays an important role in stability and activity of the enzyme.

**Key words:**  $\alpha$ -amylase, physico-chemical properties, substrate specificity, domain structure.

- Pandey A., Nigam P., Soccol C. R. et al. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2000. – **31**. – P. 135–152.
- Ikrat-ul-Haq, Javed M. M., Hameed U. et al. // *Pak. J. Bot.* – 2010. – **42**, N 5. – P. 3507–3516.
- Hmidet N., Maalej H., Haddar A. et al. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2010. – **162**, N 4. – P. 1018–1030.
- Al-Quadran F., Akel H., Natshi R. // *Ann. Microbiol.* – 2011. – **61**, N 4. – P. 887–892.
- Gangadharan D., Nampootheri K. M., Sivaramakrishnan S. et al. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2008. – **158**, N 3. – P. 653–662.
- Варбанець Л. Д., Мишак К. В., Мацелюх О. В. та ін. // *Мікробіол. журн.* – 2006. – **68**, № 2. – С. 30–38.
- Riaz A., Qadar S. A. U., Anwar A. et al. // *Internet J. Microbiol.* – 2009. – **6**, N 1.
- Mohamed S. A., Azhar E. I., Ba-Akdah M. M. et al. // *AJMR.* – 2011. – **5**, N 9. – P. 1018–1028.
- Варбанець Л. Д., Авдіюк К. В., Борзова Н. В. // *Біотехнологія.* – 2008. – **1**, № 2. – С. 39–51.
- Asgher M., Javaid Asad M., Rahman S. U. et al. // *J. Food Eng.* – 2007. – **79**, N 3 – P. 950–955.
- Arikan B. // *Bioresour. Technol.* – 2008. – **99**, N 8. – P. 4315–4320.
- Talekar S., Patil J. // *J. Cell Tissue Res.* – 2012. – **12**, N 1. – P. 3037–3042.
- Haseltine C., Rolfsmeier M., Blum P. // *J. Bacteriol.* – 1996. – **178**, N 4. – P. 945–950.
- Prakash O., Jaiswal N. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2009. – **160**, N 8. – P. 2401–2414.
- Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Nampootheri K. M. et al. // *Food Technol. Biotechnol.* – 2006. – **44**, N 2. – P. 173–184.
- Yang H., Liu L., Li J. et al. // *Microb. Cell Fact.* – 2011. – **10**. – P. 77–85.
- Rao D. M., Swamy A. V. N., SivaRamaKrishna G. // *Internet J. Genomics Proteomics.* – 2007. – **2**, N 2.
- Морозкина Е. В., Слуцкая Э. С., Фёдорова Т. В. и др. // *Прикл. биохим. микробиол.* – 2010. – **46**, № 1. – С. 5–20.
- Kuddus M., Roohi, Arif J. M., Ramteke P. W. // *AJMR.* – 2012. – **6**, N 2. – P. 206–213.
- Liu J., Zhang Z., Dang H. et al. // *AJMR.* – 2011. – **5**, N 10. – P. 1156–1162.
- Varalakshmi K. N., Kumudini B. S., Nandini B. N. et al. // *Pol. J. Microbiol.* – 2009. – **58**, N 1. – P. 29–36.
- Kiran Kumar V., Ravi Sankar N., Shailaja R. et al. // *J. Cell Tissue Res.* – 2011. – **11**, N 2. – P. 2775–2780.
- Padmini N. D., Bhattacharya S., Das A., Rajan S. S. // *Ann. Biol. Resear.* – 2012. – **3**, N 8. – P. 4082–4090.
- Варбанець Л. Д., Авдіюк К. В., Борзова Н. В. та ін. // *Мікробіол. журн.* – 2009. – **71**, № 3. – С. 3–10.
- Metin K., Koc Ö., Ateslier Z. B. B., Biyik H. H. // *Afr. J. Biotechnol.* – 2010. – **9**, N 45. – P. 7692–7701.
- Галуч И. П. Амилазы микроорганизмов. – К.: Наук. думка. – 1987. – 192 с.
- Liu X. D., Xu Y. // *Bioresour. Technol.* – 2008. – **99**, N 10. – P. 4315–4320.
- Valaparla V. K. // *Int. J. Biotechnol. Biochem.* – 2010. – **6**, N 1. – P. 25–34.
- Stamford T. L. M., Stamford N. P., Coelho L. C. B. B., Araújo J. M. // *Bioresour. Technol.* – 2001. – **76**, N 2. – P. 137–141.
- Saxena R. K., Dutt K., Agarwal L., Nayyar P. // *Bioresour. Technol.* – 2007. – **98**, N 2. – P. 260–265.
- Yang C., Liu W. // *Enzyme Microb. Technol.* – 2004. – **35**, N 2–3. – P. 254–260.
- Rao K. S., Ellaiah P., Biradar K. V. // *RGUHS J. Pharm. Sci.* – 2012. – **2**, N 1. – P. 83–89.
- Abe A., Tonozuka T., Sakano Y., Kamitori S. // *J. Mol. Biol.* – 2004. – **335**, N 3. – P. 811–822.
- Iefuji H., Chino M., Kato M., Iimura Y. // *Biochem. J.* – 1996. – **318**. – P. 989–996.
- Hasan K., Ismaya W. T., Kardi I. et al. // *Biologia.* – 2008. – **63**, N 6. – P. 1044–1050.
- Kammoun R., Naili B., Bejar S. // *Bioresour. Technol.* – 2008. – **99**, N 13. – P. 5602–5609.

37. Ghorbel R. E., Maktouf S., Massoud E. B. et al. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2008. – **157**, N 1. – P. 50–60.
38. Dheeran P., Kumar S., Jaiswal Y. K., Adhikari D. K. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – **86**, N 6. – P. 1857–1866.
39. Fogarty W. M., Bourke A. C., Kelly C. T., Doyle E. M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1994. – **42**. – P. 190–203.
40. Кубрак О. І., Луцзяк В. І. // *Біотехнологія*. – 2009. – **2**, № 1. – С. 69–79.
41. Авдіюк К. В., Варбанець Л. Д. // *Мікробіол. журн.* – 2008. – **70**, № 1. – С. 10–16.
42. Niu D., Zuo Z., Shi G.-Y., Wang Z.-X. // *Microbial. Cell Factories.* – 2009. – **8**. – P. 58–64.
43. Rajagopalan G., Krishnan C. // *Bioresour. Technol.* – 2008. – **99**. – P. 3044–3050.
44. Goyal N., Gupta J. K., Soni S. K. // *Enzyme Microb. Technol.* – 2005. – **37**, N 7. – P. 723–734.
45. Gupta R., Gigras P., Mohapatra H. et al. // *Process Biochem.* – 2003. – **38**. – P. 1599–1616.
46. Kuriki T., Hondoh H., Matsuura Y. // *Biologia (Bratislava)*. – 2005. – **60**, Suppl. 16. – P. 13–16.
47. Najafi M. F., Kembhavi A. // *Enzyme Microb. Technol.* – 2005. – **36**, N 4. – P. 535–539.
48. Ramachandran S., Patel A. K., Nampoothiri K. M. // *Braz. Arch. Biol. Technol.* – 2004. – **47**, N 2. – P. 309–317.
49. Anto H., Trivedi U., Patel K. // *Food Technol. Biotechnol.* – 2006. – **44**, N 2. – P. 241–245.
50. Ikram-ul-Haq, Shamim N., Ashraf H. et al. // *Pak. J. Bot.* – 2005. – **37**, N 2. – P. 373–379.
51. Bhardwaj S., Bhattacharya S., Anand S., Das A. // *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* – 2011. – **3**, N 4. – P. 171–181.
52. Annamalai N., Thavasi R., Vijayalakshmi S., Balasubramanian T. // *Ind. J. Microbiol.* – 2011. – **51**, N 4. – P. 424–429.
53. Uma Maheswar Rao J. L., Satyanarayana T. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2007. – **98**. – P. 345–352.
54. Mishra S., Behera N. // *Afr. J. Biotechnol.* – 2008. – **7**, N 18. – P. 3326–3331.
55. Amanullah A., Leonildi E., Nienow A. W., Thomas C. R. // *Bioprocess Biosyst. Eng.* – 2001. – **24**, N 2. – P. 101–107.
56. Akcan N. // *Rom. Biotechnol. Lett.* – 2011. – **16**, N 6. – P. 6833–6840.
57. Souza P. M., Magalhaes P. O. // *Braz. J. Microbiol.* – 2010. – **41**, N 4. – P. 850–861.
58. Khan J. A., Briscoe S. // *IJABPT*. – 2011. – **2**, N 3. – P. 37–46.
59. Baysal Z., Uyar F., Aytekin C. // *Process Biochem.* – 2003. – **38**. – P. 1665–1668.
60. Hashemi M., Razavi S. H., Shojaosadati S. A., Mousavi S. M. // *New Biotechnol.* – 2011. – **28**, N 2. – P. 165–172.
61. Štefan Janeček // *Nova Biotechnol.* – 2009. – **9**, N 1. – P. 5–25.
62. Das S., Singh S., Sharma V., Soni M. L. // *Int. J. Pharm. Sci.* – 2011. – **2**, N 1. – P. 486–496.
63. Авдіюк Е. В., Варбанець Л. Д., Сафронова Л. А., Харкевич Е. С. // *Біотехнологія*. – 2012. – **5**, № 5. – С. 91–99.
64. Mahdavi A., Sajedi R. H., Rassa M., Jafarian V. // *Iran. J. Biotechnol.* – 2010. – **8**, N 2. – P. 103–111.
65. Uma Maheswar Rao J. L., Satyanarayana T. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2007. – **142**, N 2. – P. 179–193.
66. Kubrak O. I., Storey J. M., Storey K. B., Lushchak V. I. // *Can. J. Microbiol.* – 2010. – **56**. – P. 279–288.
67. Haki G. D., Anceno A. J., Rakshit S. K. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – **24**, N 11. – P. 2517–2524.
68. Femi-Ola T. O., Olowe B. M. // *Resear. J. Microbiol.* – 2011. – **6**, N 2. – P. 140–146.
69. Nouadri T., Meraihi Z., Shahrazed D.-D. et al. // *Afr. J. Biochem. Resear.* – 2010. – **4**, N 6. – P. 155–162.
70. Ozean B. D., Baylan M., Ozean N. et al. // *Resear. J. Biol. Sci.* – 2010. – **5**, N 1. – P. 118–124.
71. Nurachman Z., Kono A., Radjasa O.K. et al. // *Am. J. Biochem. Biotechnol.* – 2010. – **6**, N 4. – P. 300–306.
72. Schwermann B., Pfau K., Liliensiek B. et al. // *Eur. J. Biochem.* – 1994. – **226**, N 3. – P. 981–991.
73. Kim T. U., Gu B. G., Jeong J. Y. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – **61**, N 8. – P. 3105–3112.
74. Bano S., Ul Qader S. A., Aman A. et al. // *AAPS Pharm. Sci. Tech.* – 2011. – **12**, N 1. – P. 255–261.
75. Konsoula Z., Liakopoulou-Kyriakides M. // *Process Biochem.* – 2004. – **39**, N 11. – P. 1745–1749.
76. Kudirat S. B. // *Afr. J. Biotechnol.* – 2009. – **8**, N 20. – P. 5487–5492.
77. Kandra L., Gyemant G., Remenyik J. et al. // *FEBS Lett.* – 2002. – **518**. – P. 79–82.
78. Кубрак О. І., Луцзяк В. І. // *Мікробіол. журн.* – 2007. – **69**, № 6. – С. 56–76.
79. Amutha K., Priya K. J. // *Int. J. Pharma Bio Sci.* – 2011. – **2**, N 2. – P. 407–413.

80. Rivera M. H., Lypez-Munguía A., Soberyn X., Saab-Rincyn G. // *Protein Eng.* – 2003. – **16**, N 7. – P. 505–514.
81. Sarian F. D., van der Kaaij R. M., Kralj S. et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – **93**, N 2. – P. 645–654.
82. Božić N., Ruiz J., Lypez-Santín J., Vujčić Z. // *J. Biochem. Eng.* – 2011. – **53**, N 2. – P. 203–209.
83. Van der Maarel M. J., van der Veen B., Uitdehaag J. C. et al. // *J. Biotechnol.* – 2002. – **94**, N 2. – P. 137–155.
84. Наумов Д. Г. // *Биохимия.* – 2011. – **76**, вып. 6. – С. 764–780.
85. Horváthová V., Janeček Š., Šturdík E. // *Gen. Physiol. Biophys.* – 2001. – **20**, N 1. – P. 7–32.
86. Sajedi R. H., Taghdir M., Naderi-Manesh H. et al. // *J. Biochem. Mol. Biol.* – 2007. – **40**, N 3. – P. 315–324.
87. Ito S., Horikoshi K. // *J. Biol. Macromol.* – 2004. – **4**, N 1. – P. 3–11.
88. Kuddus M., Roohi, Arif J. M. et al. // *Biotechnol.* – 2011. – **10**, N 3. – P. 246–258.
89. Rodríguez-Sanoja R., Ruiz B., Guyot J. P. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – **71**, N 1. – P. 297–302.
90. Tan T.-C., Mijts B. N., Swaminathan K. et al. // *J. Mol. Biol.* – 2008. – **378**, N 4. – P. 852–870.
91. Davies G. J., Wilson K. S., Henrissat B. // *Biochem J.* – 1997. – **321**, Pt. 2. – P. 557–559.
92. Nielsen J. E., Borchert T. V. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – **1543**, N 2. – P. 253–274.
93. Southall S. M., Simpson P. J., Gilbert H. J. et al. // *FEBS Lett.* – 1999. – **447**, N 1. – P. 58–60.
94. Santiago M., Linares L., Sánchez S. et al. // *Biologia (Bratislava).* – 2005. – **60**, Suppl. 16. – P. 111–114.
95. Goto M., Shinoda N., Oka T. et al. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2004. – **68**, N 4. – P. 961–963.
96. Hagihara H., Hayashi Y., Endo K. et al. // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – **268**, N 14. – P. 3974–3982.
97. Malhotra R., Noorwez S.M., Satyanarayana T. // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2000. – **31**, N 5. – P. 378–384.
98. Koshland D. E. // *Biol. Rev.* – 1953. – **28**. – P. 416–436.
99. Reddy N. S., Nimmagadda A., Sambasiva Rao K. R. S. // *Afr. J. Biotechnol.* – 2003. – **2**, N 12. – P. 645–648.
100. Uitdehaag J. C. M., van der Veen B. A., Dijkhuizen L., Dijkstra B. W. // *Enzyme Microb. Technol.* – 2002. – **30**, N 3. – P. 295–304.

Отримано 30.01.2013