УДК 579.852.11.222

МІКРОБНІ α-АМІЛАЗИ: ВИДІЛЕННЯ, ВЛАСТИВОСТІ, ПРАКТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ

Л. Д. ВАРБАНЕЦЬ, К. В. АВДІЮК, Н. В. БОРЗОВА

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

α-Амілази — одна з найбільших родин глікозидгідролаз, трансфераз та ізомераз, що належать до клану GH–H. Ферменти цієї родини окрім α-1,4-, α-1,6-зв'язків здатні гідролізувати α-1,1-, α-1,2-, α-1,3-, α-1,5-глікозидні зв'язки, містять 4 незамінні залишки амінокислот (Asp204, Asp206, Glu230, Asp297) і мають $(\beta/\alpha)_8$ або TIM-barrel каталітичний домен. Обговорюються питання щодо методів виділення і очищення α-амілаз, які охоплюють осадження органічними розчинниками і нейтральними солями, діаліз, ультрафільтрацію, гельфільтрацію, хроматографію, електрофорез тощо. Наведено сучасні дані щодо можливості продукування α-амілаз мікроорганізмами різних таксономічних груп, зокрема бактерій, мікроміцетів. Докладно висвітлюються фізико-хімічні властивості α-амілаз, їхні pH- та термооптимуми, pH- та термостабільність, молекулярні маси, вплив іонів металів і різних хімічних реагентів. Розглядається можливість використання α-амілаз у різних галузях промисловості (спиртовій, крохмале-патоковій, хлібопекарській, кондитерській, текстильній, паперовій тощо), а також у медицині.

Ключові слова: α-амілази, фізико-хімічні властивості, практичне використання.

В останні роки розширюються можливості використання мікроорганізмів як біотехнологічних джерел промислово важливих ферментів. Крохмальдеградуючі ферменти, зокрема амілази, привертають увагу дослідників завдяки їх технологічній важливості й економічній вигідності. Вони характеризуються широким спектром застосування в різних галузях, таких як клінічна, медична і аналітична хімія, у цукрофікації крохмалю, текстильній, харчовій, бродильній, фармацевтичній, паперовій, пивоварній і спиртовій промисловості. Амілази становлять близько 30% світової продукції ферментів [1]. Унаслідок підвищених потреб у цих ферментах в різних галузях промисловості існує величезний інтерес в одержанні ферментів з поліпшеними властивостями, зокрема такими, як здатність деградувати грубий (сирий) крохмаль, що робить їх придатними для застосування в деяких ефективних, але не дуже високовартісних технологіях. Особливості технологічних процесів у багатьох промислових виробництвах, де використовують амілолітичні ферменти, а саме у спиртовому, крохмале-патоковому, пивоварному, текстильному, целюлозно-паперовому, потребують використання комплексних ферментних препаратів, які були б стійкими до підвищених температур і здатними гідролізувати сировину при 80–100 °С. Перевагами високотемпературного процесу є суміщення клейстеризації крохмалю і його ферментативного гідролізу, зниження дозування ферментів, скорочення тривалості конверсії крохмалю, підвищення виходу кінцевого продукту, зменшення собівартості процесу. Здатність до біосинтезу термостабільних амілолітичних ферментів у природних штамів виявляють рідко.

α-Амілази належать до глікозидгідролаз — ферментів, здатних метаболізувати різноманітні сахариди. Їх було поділено на класи (групи) — за механізмом дії, а також на родини — на основі подібності їхньої амінокислотної послідовності. Так, існує 4 класи глікозидаз: 1) ендоамілази, які розщеплюють внутрішні α-1,4-зв'язки, утворюючи α-аномерні сполуки; 2) екзоамілази, що гідролізують α-1,4- або α-1,6-зв'язки у термінальних залишках глюкози, утворюючи α- або β-аномерні продукти; 3) ферменти, які відщеплюють виключно розгалужені α-1,6-зв'язки, утворюючи лінійний полісахарид; 4) трансферази, що розщеплюють α-1,4-глікозидні зв'язки донорної молекули і переносять частину донора до глікозидного акцептора з утворенням нового глікозидного зв'язку [2].

Концепцію такої групи ферментів, як α-амілази (ЕС 3.2.1.1; 1,4-α-*D*-глюкан глюканогідролаза), було запропоновано в 1992 р. рядом авторів [3]. Це — одна з найбільших родин глікозидгідролаз, трансфераз та ізомераз, до якої належать близько 30 різних специфічностей. Згідно із зазначеною концепцією, а також відповідно до сучасної ситуації [4, 5] члени цієї родини мають задовольняти таким вимогам: 1) виявляти гліколітичну активність, розщеплюючи α-глюкозидні зв'язки з утворенням α-аномерних моно- і олігосахаридів, або трансглікозилюючу активність, внаслідок якої утворюються α-1,4- або α-1,6-глікозидні зв'язки або комбінація обох активностей; 2) серед 14 кланів (A–N), які визначено для глікозидаз і трансглікозидаз, родина α-амілаз (1,4-α-*D*-глюкан глюканогідролаз) (GH-13) належить до восьмого клану (GH–H), який охоплює родини 13, 70 і 77. Представники одного клану характеризуються однаковою тривимірною структурою каталітичного домена, але з обмежено подібною послідовністю. Це свідчить про те, що білкова структура еволюційно краще захищена, ніж амінокислотна послідовність; 3) ферменти цієї родини можуть гідролізувати, крім α-1,4- і α-1,6-зв'язків, також α-1,1-, α-1,2-, α-1,3- і α-1,5-глікозидні зв'язки; 4) взаємозв'язки головної родини α–амілаз (клан GH–H) з родиною екстремофільних α–амілаз, родиною глікозидгідролаз 57 поки ще ані підтверджено, ані спростовано; 5) тільки 4 залишки амінокислот мають бути незамінними для представників усієї родини (Asp204, Asp206, Glu230 і Asp297, нумерація як у така-амілази). Деякі з цих консервативних амінокислот утворюють каталітичний центр, а деякі залучаються до стабільності консервативної топології TIM-barrel; 6) мати $(\beta/\alpha)_8$ або TIM-barrel (бочонок тріозофосфатізомеразного типу) каталітичний домен; 7) 4 консервативні ділянки послідовностей, які присутні у ланцюгах β3, β4, β5 і β7 каталітичного (β/α)-barrel домена, було ідентифіковано, їх використовують для визначення родини α-амілаз. В останні роки дослідники [6] встановили наявність трьох додаткових ділянок консервативної послідовності, дві з яких розташовані на ланцюгах β2 і β8 каталітичного (β/α)-barrel і одна — поблизу С-кінця домена В у β3-α3-зв'язку каталітичного (β/α)-barrel. Тимчасом як 4 ділянки первісно консервативної послідовності містять каталітичні і субстратзв'язувальні залишки індивідуальних членів родини, останні 3 ділянки консервативної послідовності містять амінокислотні залишки, які зумовлюють специфічність даного ферменту. Автори припускають, що ферменти родини α-амілаз мають бути охарактеризовані як такі, що містять так багато ділянок консервативної послідовності, як тільки можливо.

Відомо, що ферменти родини α-амілаз містять 3 суттєвих каталітичних залишки Asp206, Glu230 і Asp297, які строго консервативні як в амінокислотній послідовності, так і в тривимірній структурі. Мутагенез будь-якого із цих залишків на іншу амінокислоту призводить до майже повної втрати активності. Функціональні ролі Glu230 і Asp206, як прийнято вважати, такі, що беруть участь у каталізі як кислота (донор протона) і луг (нуклеофіл), відповідно. Однак критичну роль третього залишка Asp297 не було описано. Автор [7] показав, що Asp297 централізовано працює для зв'язування субстрату, що призводить до деформації кальцію субстрату в точці розщеплення, яка є цілковито необхідною для каталізу. Таким чином, показано роль цього залишка як «фіксатора» в каталізі α-амілазних ферментів.

У табл. 1 наведено відомі на сьогодні глікозилгідролази родини 13 [8].

α-Амілази ізолюють із різних біологічних джерел: тварин (панкреатична або слинна), злакових (пшениці або ячменю), грибів (види *Aspergillus*) і бактерій (види *Bacillus*). До бактеріальних α-амілаз належать такі, що працюють як при нормальній температурі (представники *B. subtilis*), так і при дуже високих температурах (*B. licheniformis*). α-Амілази каталізують розщеплення α-1,4-глікозидних зв'язків в амілозі й амілопектині, які є первинними компонентами очищених крохмалів, що їх використовують під час приготування тіста. Вони зумовлюють швидке зменшення довжини полімера крохмалю. Утворювані фрагменти є олігосахаридами, які розчинні у воді й надто короткі, щоб зберігати здатність до адгезії.

α-Амілази відіграють суттєву роль у метаболізмі α-глюкану. Кристалічну структуру раніше не ідентифікованої амілази (AmyC) з *Thermotoga maritima* було визначено за MAD (Multi-wavelength anomalous dispersion). Цей метод застосовують у Х-променевій кристалографії [9]. У AmyC відсутня послідовність, яка аналогічна канонічним α-амілазам, що належать до родин гідролаз 13, 70 і 77, однак виявляють суттєву подібність із групою ще не охарактеризованих білків у COG1543, і споріднена

Таблиця 1. **Відомі глікозидгідролази родини 13 [8]**

Фермент	Номер згідно ЕС	Головний субстрат
Амілосахараза	2.4.1.4	Сахароза
Сахарозофосфорилаза	2.4.1.7	Сахароза
Глюканрозгалужувальний фермент	2.4.1.18	Крохмаль, глікоген
Цикломальтодекстрин глікозилтрансфераза	2.4.1.19	Крохмаль
Аміломальтаза	2.4.1.25	Крохмаль, глікоген
α-Амілаза, що утворює мальтопентаозу	3.2.1	Крохмаль
α-Амілаза	3.2.1.1	Крохмаль
Оліго-1,6-глюкозидаза	3.2.1.10	1,6-α-*D*-зв'язки у деяких олігосахаридах
α-Глюкозидаза	3.2.1.20	Крохмаль
Амілопулулоназа	3.2.1.41	Пулулан
Цикломальтодекстриназа	3.2.1.54	Лінійний і цикломальтодекстрин
Ізопулулоназа	3.2.1.57	Пулулан
Ізоамілаза	3.2.1.68	Амілопектин
α-Амілаза, яка утворює мальтотетраозу	3.2.1.60	Крохмаль
Глюкодекстраназа	3.2.1.70	Крохмаль
Трегалозо-6-фосфатгідролаза	3.2.1.93	Трегалоза
α-Амілаза, яка утворює мальтогексаозу	3.2.1.98	Крохмаль
α-Амілаза, яка утворює мальтозу	3.2.1.133	Крохмаль
Неопулуланаза	3.2.1.135	Пулулан
Мальтоолігозилтрегалозогідролаза	3.2.1.141	Трегалоза
Мальтоолігозилтрегалозосинтаза	5.4.99.15	Мальтоза

з родиною гліцеролгідролаз 57 (GH-57). AmyC виявляє риси, характерні для α-амілаз, такі, зокрема, як скривлена TIM-barrel структура, утворена 7 β- і α-геліксами (домен A) та двома додатковими, але менш консервативними доменами. Один із них — домен B, який містить 3 гелікси, які вставлені в TIM-barrel після β-гелікса 2, а другий — домен C, у якого 5 геліксових зон на C-кінцях. Цікаво, що, незважаючи на помірну спорідненість гомології, порівняння структур виявило значну спорідненість із членами GH-57, які характеризуються добре відомою тривимірною структурою 4-глюканотрансферази *Thermococcus litoralis*, і навіть більшу спорідненість зі структурою ферменту невідомої функції *Thermus thermophilus*.

Методи виділення й очищення α-амілаз

Оскільки α-амілаза у більшості мікроорганізмів є екстрацелюлярним ферментом, то операції з її виділення й очищення зводяться до такого:

1) відділення клітинної біомаси від культуральної рідини;

2) очищення і концентрування розчинів, які містять вихідний фермент, за допомогою вакуум-концентрування, осадження з розчинів органічними розчинниками та нейтральними солями, діаліз, ультрафільтрація, гель-фільтрація, електрофорез, хроматографія тощо.

І. П. Галич [10] розробила спосіб одержання високоочищеного препарату α-амілази *A. oryzae*, який за основними властивостями відповідає кристалічному. Метод складається з дуже простих операцій (осадження спиртом, стабілізація іонами Ca^{2+}, висолювання сульфатом амонію та діаліз) і дозволяє отримати фермент з виходом 50–60 % за активністю, що в 3–4 рази перевищує вихід у разі кристалізації. Запропонований спосіб може стати основою виробничого одержання ферменту з метою його використання в медицині і в деяких галузях харчової промисловості. Препарати високоочищеної α-амілази мали амілолітичну активність 5 040–5 400 одиниць, містили 70–71% білка, 12–13% вуглеводів, 8–10% пептидів, 6–7% вологи і 3–4% золи.

Очищення α-амілази з іншого штаму *A. oryzae* [11] проводили шляхом діалізу фільтрату глибинної культури і подальшою хроматографією на колонці з ДЕАЕ-целюлозою. Кількість α-амілази в отриманій фракції становила близько 90% від загальної кількості ферменту, який наносили на колонку, і більше 20% від загальної кількості білка. Подальше очищення ферменту здійснювали

методом гель-хроматографії на колонці з сефадексом G-100. У результаті вдалося відокремити фермент від залишкової кількості неактивних білкових домішок. На очищеному ферменті встановлено, що кінцевою амінокислотою є аланін.

Колонковий метод на основі використання пористого технічного катіоніту КМ-2ПК було застосовано для виділення α-амілази з культуральної рідини *A. oryzae*. Попереднє введення іонів кальцію в матрицю катіоніту підвищувало сорбційну ємність та селективність зв'язування і забезпечувало збереження нативної структури ферменту, оскільки макромолекула α-амілази містить у своїй структурі декілька атомів кальцію, які стабілізують її активну конформацію. Уперше було показано, що сорбційна іммобілізація на полімерах, які мають у своїй структурі позитивно і негативно заряджені групи, запобігає афінній десорбції амілази розчином субстрату. У результаті на основі використання амілаз, що іммобілізовані на каучукових катіонітах (СКН), було створено колонковий реактор, який був здатен працювати протягом 10–12 днів, і показано можливість використання зв'язаних амілаз для ферментативного гідролізу крохмалю. Препарати іммобілізованих амілаз залишались активними під час зберігання в замороженому стані протягом року [12].

У процесі вивчення амілолітичної активності *A. niger-475* досліджуваний розчин ферментного препарату одержували осадженням фільтрату глибинної культури чотирма об'ємами етилового спирту і наступним діалізом осаду, після чого його піддавали розділенню на колонці з ДЕАЕ-целюлозою. У такий спосіб було отримано препарат, який складався з двох білків — α-амілази і глюкоамілази. Питома активність α-амілази після хроматографії на іонообміннику зросла з 0,25 Од · мл$^{-1}$ до 1,2 Од · мл$^{-1}$ [11].

Виділення α-амілази з гриба *A. flavipes*, добутого з морської води, здійснювали, вдаючись до стандартних методів — хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі й сефадексах G-75, G-100. У результаті одержали три фракції амілаз з різними фізико-хімічними властивостями [13].

В. М. Шкуматов зі співавт. [14] розробили схему отримання з культуральної рідини *B. subtilis* α-амілази у гомогенному стані, яка включала такі стадії очищення, як фракціонування сульфатом амонію, іонообмінну та гель-хроматографію.

Н. А. Кічакова [15] для розділення та очищення амілолітичних ферментів, що синтезуються штамом *Bacillus sp. 86*, застосовувала класичні методи білкової хімії: фракціонування білків насиченим розчином сульфату амонію, іонообмінну й афінну хроматографію, гель-фільтрацію. На етапі видалення протеїназ, які майже завжди утворюються паралельно з амілазами, із ферментного розчину хроматографією на бацитрацин-силохромі здійснили розділення амілолітичних ферментів на дві фракції. Ці ферменти були очищені до гомогенного стану. Перший із них становив типову α-амілазу *Bacillus*. Другий, який поряд з амілолітичною виявляв і пулуланазну активність, імовірно, належить до пулуланаз, однак не виключена можливість, що це амілаза, яка розщеплює 1,4-глюкозидні зв'язки у крохмалі й пулулані.

Комбінація методів хроматофокусування і гель-фільтрації дозволила здійснити ефективне очищення α-амілази із *B. licheniformis*. Із застосуванням вищезазначених методів фермент було очищено у 77 разів [16].

Фізико-хімічні та каталітичні властивості амілаз

Відомо, що продуцентами амілаз є мікроміцети (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*) і бактерії (*Bacillus*). Дані щодо деяких їхніх фізико-хімічних властивостей наведено в табл. 2.

Дослідження α-амілаз *A. flavus*, *A. awamori* та *A. oryzae* [17] показало, що вони характеризувались однаковими значеннями pH-оптимумів активності 5,0–5,25; зона їхньої pH-стабільності — 6,0–8,0; точка найбільшої стійкості — 7,0. Усі три α-амілази стабільні при кімнатній температурі, утім фермент *A. flavus* був стійкішим до нагрівання, ніж *A. awamori* та *A. oryzae*, і при 55 °С протягом 1 год зберігав 70% вихідної активності. Температурний оптимум α-амілази *A. flavus* — 50 °С, а α-амілаз *A. awamori* та *A. oryzae* — 40 °С. Стабільність досліджуваних ферментів до теплової денатурації підвищувалась у присутності субстрату (крохмалю). Галогеніди у концентрації 0,25 М не стабілізували α-амілази, а навпаки, прискорювали їх інактивацію. Цей вплив зростав у послідовності $Cl^- < Br^- < F^- < I^-$ і притаманний усім трьом ферментам. Сечовина концентрацією від 1,0 до 6,0 М денатурувала білки. Інактивуюча дія була більш вираженою для α-амілаз *A. awamori* та *A. oryzae*, стійкішим був фермент із *A. flavus*. ЕДТА — сильний інгібітор усіх трьох α-амілаз, а атоми кальцію — важливі для їхньої активності й стабільності.

Таблиця 2. **Фізико-хімічні властивості деяких α-амілаз**

Джерело виділення	Молекулярна маса, кДа	Оптимум дії		Інгібітор	Активатор
		pH	t, °C		
Aspergillus flavus *A. awamori* *A. oryzae* [17]	–	5,0–5,25	50 40 40	ЕДТА	Ca^{2+}
A. flavipes [18] 1 2 3	50 63 50	6,0–7,5 5,5 5,5; 7,5	30–50 30–50 60–80	ЕДТА Cu^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}	Ca^{2+}
A. niger [19]	–	4,0	50-55	–	–
Bacillus sp. 86 [21]	83–90	6,0; 8,5	85–90	–	–
Bacillus sp. PN5 [22]	–	10,0	90	–	–
B. subtilis [24]	48	–	–	Zn^{2+}, Fe^{2+}, Pb^{2+}, Hg^{2+}, Mg^{2+}, Cd^{2+}, Cu^{2+}	–
B. subtilis JS-2004 [25]	–	7,0	50	Cu^{2+}, Hg^{2+}, Co^{2+}	Ca^{2+}
B. licheniformis MIR-61 [26]	–	7,0	45	–	
Geobacillus thermodenitrificans HR-010 [32]	58	5,5	80	ЕГТА, ЕДТА	
Thermomyces lanuginosus F1 [35]	55	4,0	–	Гуанідин-HCl, сечовина, ЕДТА	Cu^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}

Примітка: «–» — даних нема; ЕГТА — етиленглікольтетраацетат; ЕДТА — етилендіамінтетраацетат.

Оскільки мікробна конверсія крохмалю і дотепер залишається одним із важливих напрямів досліджень у біотехнології, для удосконалення біотехнологічних процесів необхідним є пошук високоефективних амілолітичних ферментів з новими властивостями. Так, автори [18] із 245 штамів морських грибів відібрали перспективний продуцент позаклітинних амілаз — *Aspergillus flavipes* і показали, що залежно від умов культивування він здатен продукувати різні амілолітичні комплекси. На живильному середовищі, яке містить пептон і дріжджовий екстракт (pH 7,0), *A. flavipes* синтезував три форми амілази, які відрізнялись оптимумом pH. Зміна початкового значення pH середовища (8,6) або видалення з живильного середовища пептона супроводжувалось утворенням однієї з форм ферменту. Присутність протеолітичних ферментів знижувала активність ізольованих форм амілаз. У разі внесення в живильне середовище інгібітору протеаз діізопропілфторфосфату синтезувалась нова форма амілази з оптимумом pH 5,5 та 7,5, максимальною активністю при 60–80 °C і високою стабільністю. Амілаза 1 виявляла активність у широкому діапазоні значень pH (5,5–8,0), оскільки становила суміш двох молекулярних форм: кислої (м.м. 50 кДа, оптимальне значення pH 6,0, термооптимум 30–50 °C) і лужної (м. м. 14,5 кДа, оптимум pH 7,5, термооптимум 30–50 °C) амілаз. Амілаза 2 мала характерні для більшості грибних амілаз властивості: м. м. 63 кДа, оптимум pH 5,5, максимальна активність у діапазоні температур 30–50 °C і температурна стабільність до 50 °C. Однак досліджувані форми амілаз були нестабільними у процесі виділення внаслідок присутності протеолітичних ферментів. Амілаза 3 (м. м. 50 кДа) помітно відрізнялась від вищезазначених форм ферменту. Вона виявляла активність у широкому діапазоні pH (5,5–8,5), два максимуми активності при 5,5 і 7,5 і температурі 60–80 °C, мала високу термостабільність (70 °C) і зберігала початкову активність упродовж 20 днів при температурі 22 °C за обох значень pH. Амілаза 3 була металозалежним ферментом, її активність підвищували іони Ca^{2+} і Mg^{2+}, інгібували — ЕДТА й деякі метали — Cu^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}. На відміну від амілаз морських бактерій, амілаза морського гриба *A. flavipes* виявляла стійкість до екстремально високих концентрацій солі (15% NaCl).

A. niger 1119 під час глибинного вирощування продукував амілази з високою активністю (3,9 Од·мл$^{-1}$) при 50–55 °C і pH 4,0 і зберігав стабільність при 53 °C протягом 200 год. Для того щоб встановити, чи можна використовувати цей фермент у процесі очищення, різні детергенти досліджували

з використанням екстракту амілази *A. niger* і встановили можливість їх застосування для очищення хірургічних і ендоскопічних інструментів [19].

Деякі дослідники [20] показали здатність Твін-80 і рамноліпіду стимулювати активність позаклітинної амілази *Penicillium simplicissium*.

Амілазу виявили також у різних представників бактерій, як патогенних (*Vibrio cholerae*, *B. anthracis*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pneumococcus*), так і непатогенних (*B. mesentericus*, *B. subtilis*, *B. macerans*) видів. Промислове значення, безумовно, можуть мати і фактично мають лише непатогенні бактерії. На особливу увагу заслуговують термостабільні амілази, які здатні гідролізувати нативний крохмаль і витримувати високі концентрації солей, а також лужні амілази, оскільки більшість відомих грибних амілаз, що їх широко застосовують у промисловості, виявляють активність у кислому середовищі.

Амілолітичні ферменти термофільного штаму *Bacillus sp.* 86 виявляли активність при температурі 30–95 °С (термооптимум 85–90 °С) і в інтервалі значень pH 5,0–10,5 з двома pH-оптимумами (6,0 і 8,5). Активність препарату при 60 °С залишалася без змін протягом 4 год, а час його напівактивації при цій температурі — 9 год, при 90 °С активність препарату не змінювалась упродовж 50 хв, а час напівактивації становив 2 год [21]. Здатність досліджуваного ферменту здійснювати гідроліз крохмалю в умовах слабокислого, нейтрального і лужного середовищ є істотною перевагою перед іншими α-амілазами і зумовлює можливість використання його як каталізатора різних промислових реакцій розрідження крохмалевмісної сировини. Іони кальцію, які не впливають на активність α-амілази, значно підвищують стабільність ферменту, до того ж потреба в іонах цього металу зростає з підвищенням температури інкубації. Крохмалю, як специфічному субстрату α-амілази, також притаманний високий стабілізувальний ефект. У 22,5%-му розчині крохмалю α-амілаза *Bacillus sp. 86* за відсутності іонів кальцію цілком стабільна протягом 100 хв при 90 °С і 80 хв при 100 °С. Встановлено, що даний фермент є глікопротеїном. Білкова глобула ферменту тісно зв'язана з вуглеводним компонентом, який становить до 16% сухої маси. Молекулярна маса α-амілази дорівнює 83–90 кДа. Молекула α-амілази *Bacillus sp. 86*, що містить 16 амінокислот і налічує в середньому 254 амінокислотних залишки, відзначається високим вмістом аспарагінової і глутамінової кислот, аланіну, валіну і триптофану. У молекулі ферменту не виявлено цистеїну. Припускають, що роль дисульфідних зв'язків у створенні структури термостабільної α-амілази відіграють іони кальцію [15].

Високотермостабільну амілазу, яка продукується *Bacillus sp.* PN5, було ізольовано з ґрунту [22]. У разі вирощування на середовищі, яке містить (%) крохмаль (0,6), пептон (0,5) і дріжджовий екстракт (0,3), при 60 °С, pH 7,0, упродовж 60 год активність амілази, яка продукувалась, становила 65,23 Од/мл. Максимуму активності було досягнено при pH 10,0 і температурі 90 °С. Активність ферменту пригнічувалась при 105 °С на 65%, а при температурі від 80 до 100 °С була стабільною протягом 1 год. Фермент зберігав 83% активності після 1 год інкубації з додецилсульфатом натрію. Ці властивості вказують на можливість використання даної амілази при цукрофікації крохмалю і утворенні детергенту.

У Росії на цей час у промисловому масштабі виробляють препарати α-амілази на основі двох продуцентів — *B. subtilis* (амілосубтилін) і *A. oryzae* (амілоризин) [23]. Однак ці амілази не належать до термостабільних ферментів, оскільки оптимальна температура їхньої дії 55–65 °С. Автори [23] методами мутагенезу і селекції одержали високопродуктивний штам *B. licheniformis* 103, який здатен синтезувати термостабільну α-амілазу (температурний оптимум 90–95 °С, pH-оптимум 6,0–8,5). Оптимізацією складу ферментаційного середовища і умов глибинного культивування продуцента їм вдалося майже у 8 разів у порівняно з вихідним штамом підвищити активність амілази, яка становила 260 Од $\cdot$ мл$^{-1}$.

За допомогою іонообмінної хроматографії і гель-фільтрації очистили позаклітинну α-амілазу *B. subtilis* [24]. Молекулярна маса її дорівнювала 48 кДа. Різноманітні іони металів навіть за низьких концентрацій інгібували активність α-амілази. Ca^{2+}, Ba^{2+}, Mn^{2+} і Ni^{2+} були слабкими, а Zn^{2+}, Fe^{2+}, Pb^{2+}, Hg^{2+}, Mg^{2+}, Cd^{2+} і Cu^{2+} — сильними інгібіторами. Високі концентрації Ca^{2+} сприяли зниженню ферментативної активності, а за концентрації 2,5 мМ активність підвищувалась. ЕДТА також впливав на активність, аналогічно до впливу Ca^{2+} за низьких концентрацій. Відзначено підвищення активності ферменту в разі використання іонів металів у концентрації 10 мМ. Показники K_m і V_{max} для α-амілази становили $2{,}2 \cdot 10^{-4}$ г $\cdot$ мл$^{-1}$

і 0,020 Од · мл$^{-1}$, 2,91 · 10^{-4} г · мл$^{-1}$ і 0,016 Од · мл$^{-1}$; 4,04 · 10^{-4} г · мл$^{-1}$ і 0,021 Од · мл$^{-1}$ у випадку використання як субстратів крохмалю, амілози і глікогену, відповідно.

Автори [25] ізолювали штами *B. subtilis* JS-2004 з максимальною активністю 72 Од · мл$^{-1}$ під час вирощування на рідкому середовищі з картопляним крохмалем упродовж 48 год при pH 7,0 і 50 °C. Додавання іонів Ca^{2+} і дріжджового екстракту підвищувало продукування ферменту, тимчасом як додавання 1% глюкози сприяло значному інгібуванню. Оптимальної активності було досягнено при pH 8,0 і 70 °C. Фермент був стабільним протягом 1 год при 60 і 70 °C, водночас при 80 і 90 °C вихідна активність втрачалась на 12 і 48%, відповідно. Фермент активували іони Ca^{2+} (117%), значною мірою інгібували іони Co^{2+}, Cu^{2+} та Hg^{2+} і меншою мірою Mg^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+} і Mn^{2+}. Штам продукував високі рівні α-амілази, яку можна використовувати в крохмале-патоковій та харчовій промисловості.

Зі зразків південноамериканських ґрунтів виділено штам *B. licheniformis MIR-61*, який продукував підвищену кількість кислої α-амілази. У періодичних культурах *B. licheniformis MIR-61* у фазі експоненційного росту виявляли позаклітинні α-амілази та глюкозидази. Максимальної активності α-амілази було досягнено при 45 °C і pH 7,0 у пізній експоненційній фазі. Оптимум активності цього ферменту спостерігався при 50–67 °C і pH від 5,5 до 6,0. α-Амілаза характеризувалася термостабільністю при 60 °C [26].

α-Амілаза *B. licheniformis* є високостабільним ферментом, який широко використовують у біотехнологічних процесах. Незважаючи на те, що її продукує не термофільна бактерія, вона зберігає активність протягом декількох годин при температурі, вищій за 90 °C , в умовах промислового гідролізу крохмалю. Вона також більш стабільна, ніж α-амілаза *B. stearothermophilus і B. amyloliquefaciens,* попри значну подібність послідовностей між цими трьома білками. α-Амілаза *B. licheniformis є* цікавою моделлю для білкової інженерії під час дослідження термостабільності й термостабілізації. Автори [27] здійснили мутаційний і структурний аналіз α-амілази *B. licheniformis,* для того щоб з'ясувати походження незвичайних термальних властивостей і, якщо можливо, підвищити термостабільність ферменту. Ще до того як було встановлено тривимірну структуру, дослідники використали мутагенез та ідентифікували два критичних положення, в яких заміщення амінокислот може або підвищити, або знизити значною мірою необоротну термоінактивацію. Коли детальну Х-променеву структуру α-амілази *B. licheniformis* було встановлено, заснований на структурі мутагенез застосували для визначення ролі залишків, які залучаються до утворення сольових містків, зв'язування з кальцієм або потенціальних процесів деамідування. Результати дослідників [27] свідчать про ключову роль домена В та його взаємодії з доменом А у термостабільності α-амілази *B. licheniformis.* Більшість мутацій, які автори вводили в цю ділянку, так чи інакше модифікували стабільність завдяки впливу на електростатичну взаємодію тріади металів Ca–Na–Ca у місці контакту доменів А/В. Мутаційні дослідження показали важливість тріади металів для підтримання правильного вигину домену А, а також розщеплення конформації активного центру. Однак подібний тріадний металзв'язувальний центр також присутній у менш термостабільних бактеріальних гомологів, таких як *B. stearothermophilus* і *B. amyloliquefaciens.* Тому підвищена термостабільність α-амілази *B. licheniformis* не може бути зумовлена присутністю цієї тріади металів. У процесі мутаційних досліджень автори сконструювали понад 500 варіантів амілази, що несли від однієї до численних мутацій, серед яких було багато як високошкідливих, так і певною мірою корисних для стабільності. Кумулятивний ефект мутацій дав дослідникам можливість модулювати стабільність ферменту в діапазоні 50 °C , включаючи значне втручання в амілолітичну функцію. Незважаючи на те, що повного розуміння походження природної термостабільності α-амілази *B. licheniformis* ще не досягнено, дослідження авторів показали, що вона не є оптимальною і що є можливість підвищувати або знижувати її штучно декількома шляхами, використовуючи як випадковий, так і цілеспрямований мутагенез. Цікаво, що інженерно створені гіпертермостабільні варіанти α-амілази *B. licheniformis* є також більш стабільними за низьких значень pH.

Вивчаючи взаємодію α-амілази *B. amyloliquefaciens* з дивалентними катіонами кальцію і кобальту, дослідники [28], встановили 17 сайтів зв'язування кальцію на ферменті зі слабкою позитивною кооперативністю. Зв'язування як кальцію, так і кобальту є екзотермічним процесом. Кальцій стабілізував фермент проти сурфактантів і термальної денатурації. Більш того, зв'язування з кальцієм запобігало спонтанному

зменшенню біологічної активності α-амілази. На ферменті існує 25 некооперативних сайтів для зв'язування іонів кобальту. Активність ферменту значно підвищується зі збільшенням концентрації кобальту, але температура денатурації ферменту знижується. Таким чином, дивалентні катіони кальцію і кобальту діють як стабілізатор і активатор, відповідно, для α-амілази *B. amyloliquefaciens.*

Дослідники показали [29] здатність продукувати високоактивну амілазу для штамів *Streptomyces somaliensis* GS 1242 і *Streptomyces sampsonii* GS 1322.

Зростаючи на середовищі з глюкозою, *Clostridium acetobutyricum* продукує позаклітинну α-амілазу. Фермент достатньо охарактеризований біохімічно, однак його ген поки що не ідентифіковано. Ген *amyP* кодує 80 013-$Д_а$ зрілий білок з N-кінцевим доменом, який є ідентичним такому родини 13 глікозилгідролаз, таких як α-амілаза *Bacillus*. Транскрипційний аналіз показав, що *amyP* транскрибується в розчині хемостатної культури. Наведені дані відповідають активності α-амілази, а це свідчить про те, що експресія *amyP* регулюється на транскрипційному рівні. *AmyP* локалізували на мегаплазміді pSOL1, яка несе всі гени, що беруть участь у кінцевій стадії утворення розчину. Дегенерація *C. acetobutyricum* пов'язана зі втратою pSOL1. Показано, що *amyP* можна використати як рецепторну систему для характеристики цього явища [30].

Новий термофільний спороутворювальний штам MR3C^t, що його ізольовано з геотермального ґрунту, локалізованого на горі Ріттманн в Антарктиці, був здатен продукувати позаклітинну амілазу. На основі 16 S рРНК-послідовності було показано, що штам близький до *Anoxybacillus amylolyticus* [31].

З *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10 [32] виділено й очищено до гомогенного стану (13,6 раза, 11,5% вихід) α-амілазу. Молекулярна маса, визначена за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу, становила 58 кДа. Активність була оптимальною на картопляному крохмалі при pH 5,5 і 80 °С. У присутності іонів Ca^{2+} залишкова активність досягала 92% після 1 год інкубації при 70 °С. α-Амілаза не втрачала активності у присутності фітату (селективний інгібітор α-амілази) у концентрації 10 мМ і зберігала 90% максимальної активності після 1 год інкубації при 70 °С. ЕГТА і ЕДТА були сильними інгібіторами ферменту. α-Амілаза гідролізувала розчинний крохмаль при 80 °С з K_m 3,05 мг·мл$^{-1}$ і V_{max} 7,35 Од·мл$^{-1}$.

Здатність до продукування позаклітинної α-амілази було виявлено і в галофільної бактерії *Halomonas meridiana* [33]. Найвища продукція α-амілази спостерігалась наприкінці логарифмічної фази під час зростання культури на середовищі з 5% солей чи крохмалю за відсутності глюкози. Фермент виявляв максимальну активність при pH 7,0, але був відносно стійким і в лужних умовах. Оптимальні значення температури і солоності для активності α-амілази становлять відповідно 37 °С і 10% NaCl.

У біотехнологічних процесах, а саме у ферментативному гідролізі крохмалю у процесі одержання глюкози, використовують амілолітичні ферменти, які синтезуються термофільними археями [34].

Здатність до синтезу термостабільної α-амілази виявлена у *Thermomyces lanuginosus* F_1. Молекулярна маса й ізоелектрична точка для цього ферменту становили відповідно 55 кДа і 4,0. Максимальну стабільність α-амілаза виявляла при pH 4,0 і зберігала > 80% активності за pH 5,0–6,0 протягом 24 год. Після інкубації при 90 °С упродовж 1 год α-амілаза зберігала лише 6% активності. Активність ферменту зростала у присутності Mn^{+2}, Co^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2} і Fe^{+2}, але інгібувалася гуанідин-HCI, сечовиною і ЕДТА. Цей фермент має такі параметри pH і термостабільності, які роблять його перспективним для промислового використання [35].

Таким чином, представники різних таксономічних груп мікроорганізмів здатні продукувати активні α-амілази, з різноманітними фізико-хімічними властивостями, що визначає практичне використання їх у різних сферах життєдіяльності людей.

Практичне застосування α-амілаз

Відомо, що α-амілазу *Aspergillus* вже протягом багатьох століть використовують у промисловому виробництві для виготовлення соєвих соусів і напою саке. Соєві соуси виготовляють із автоклавованих соєвих бобів, які інокулюють культурою *Aspergillus*, переважно *A. flavus*, після інтенсивного розвитку матеріал переносять у сольовий розчин, куди додають також дріжджі. Тут відбувається тривалий (приблизно рік) процес дозрівання, протягом якого продукт набуває специфічного смаку й аромату. Саке — напій, що містить від 12 до 15% алкоголю, виготовляють із рису. Рис спочатку автоклавують, потім оцукрюють дією койї (койя — ферментативний препарат, що є продуктом сукупності декількох видів *Aspergillus*,

вирощених на пшеничних висівках і соєвих бобах, переважають *A. flavus* і *A. oryzae*), після чого гідролізат зброджують, додаючи дріжджі [36].

На сьогодні за кордоном описано близько 200 поліферментних лікарських засобів, що їх застосовують для поліпшення травлення, зокрема при диспепсії, гастриті, діареї [37]. Разом із ліпазами і/або протеазами, амілази можуть бути використані для лікування травних розладів, при панкреатитах, циститних фіброзах, діабеті типу I і/або типу II.

Так, у Латвії в 90-х роках минулого століття випускали препарат сомілаза, який містив ліполітичний і амілолітичний ферменти і використовувався для поліпшення травлення [38].

Ефективну лікувальну й лікувально-профілактичну дію справляють засоби, до складу яких входить амілаза і якими послуговуються у стоматології [39].

Два амілолітичні препарати: амілосубтилін Г3х-1 та амілосубтилін Г10х-1 застосовують у косметиці. Ці препарати одержують у вигляді порошків різного ступеня чистоти й активності під час глибинного культивування *B. subtilis*. Препарат типу Г3х-1 виробляють розпилювальним висушуванням упареного фільтрату культуральної рідини, а препарат Г10х-1 — осадженням упареного фільтрату культуральної рідини органічним розчинником (етиловий спирт). Препарати відрізняються за активністю: у амілосубтиліну Г3х-1 стандартна активність 600 Од/г за колориметричним методом, а в амілосубтиліну Г10х-1 — 3 000 Од/г. Оптимальні умови дії обох препаратів — pH 6 і температура 50–55 °С [40]. Зниженням у 1,5–2 рази в'язкості культуральної рідини під впливом глікозидази Г3х було поліпшено технологію виробництва ферментних препаратів α-амілази *B. subtilis*. У процесі одержання амілосубтилину Г3х ферментативне розрідження дозволило висушити культуральну рідину з підвищеним ступенем концентрування в 1,5–2,5 раза і збільшити продуктивність розпилювальної сушарки на 13%, а у виробництві амілосубтилину Г10х — збільшити швидкість фільтрації культуральної рідини в декілька разів і скоротити втрати амілолітичної активності на 10%. Оброблення культуральної рідини глікозидазою не призводить до втрати амілолітичної активності, що дозволило інтенсифікувати технологічні процеси виділення α-амілази [41].

Амілази набули широкого біотехнологічного застосування в таких галузях, як текстильна, фармацевтична, харчова, у виробництві мийних засобів. Гідролітичні ферменти здатні до 100%-ї деградації, і тому ферментативні детергенти можуть забезпечити ефективне очищення в разі використання тільки теплої води.

Сучасна технологія виробництва глюкози, мальтози та інших вуглеводів, які використовують у харчовій біотехнології, базується на гідролізі крохмалевмісної сировини високоактивними ферментами α-амілази і глюкоамілази.

Для промислового одержання препаратів бактеріальної α-амілази, окрім *B. subtilis*, використовують також культури *B. amyloliquefaciens* і *B. licheniformis*. α-Амілазу *B. amyloliquefaciens* застосовують для гідролізу крохмалю при температурі до 90 °С. Однак галузь промисловості, де є переробка крохмалю, зацікавлена в підвищенні температури гідролізу. Це стало можливим після одержання α-амілази із *B. licheniformis*. Ця амілаза дозволяє проводити гідроліз крохмалю при температурі до 105–110 °С. *B. amyloliquefaciens* у процесі культивування утворює, окрім α-амілази, нейтральну протеазу, α-глюканазу, геміцелюлазу. Під час гідролізу крохмалю присутність протеази небажана, оскільки деградація білкових фракцій крохмалю призводить до потемніння сиропу. З огляду на це для одержання більшості комерційних препаратів α-амілаз використовують штами, які не продукують протеазу. Винятком є α-амілази *B. licheniformis*. Їхня висока термостабільність дозволяє позбутися небажаних домішок протеази термічною інактивацією без значних втрат α-амілазної активності.

Бактеріальні α-амілази випускають переважно у вигляді рідких препаратів, що містять як консервант 20%-й розчин хлориду натрію, але бувають і тверді препарати.

На ринок окрім бактеріальних надходять також α-амілази грибного походження. Для їх одержання застосовують культури *A. oryzae* і *A. niger*. Так, α-амілаза *A. oryzae* є основним компонентом ферментного препарату така-діастаза, що є одним з найперших ферментних препаратів цієї групи, який почали виробляти. Оптимальне для дії цієї амілази значення pH лежить в інтервалі 4,8–5,8, а термостабільність її нижча, ніж у α-амілази *B. amyloliquefaciens*.

Властивості α-амілази *A. niger* мало чим відрізняються від властивостей α-амілази *A. oryzae*. Деякі штами *A. niger* продукують амілазу, яка зберігає стабільність у ще кислішому середовищі (при pH < 2) і є більш

термостійкою. Однак препарати α-амілази *A. niger* мають обмежене застосування через низьку амілазну активність і, отже, їхню високу вартість.

Препаратам α-амілази *Aspergillus* притаманна більша оцукрювальна здатність порівняно з препаратами α-амілази *Bacillus*: з їхньою допомогою можна досягти вищого виходу цукрів (50%-й вихід мальтози під час гідролізу крохмалю) [42].

У виробництві спирту як основний ферментовмісний матеріал раніше застосовували солод, який від початку виникнення спиртової промисловості використовували для оцукрювання крохмалю сировини і який з успіхом було замінено на культури мікроміцетів з активним амілолітичним комплексом ферментів [43]. Застосування у процесі виробництва спирту грибної амілази замість солоду дозволяє: а) зекономити десятки тисяч тонн високоякісного зерна; б) підвищити вихід спирту; в) різко скоротити в часі процес одержання ферментного препарату. Як відомо, для одержання активного зернового солоду потрібно 7–8 діб, для вирощування ж культури гриба й отримання з неї препарату ферменту — кілька десятків годин; г) зменшити кількість виробничих площ, а також усіх видів енергії.

У пивоварінні амілази використовують замість зернового солоду. Смакові якості пива при цьому практично не змінюються. Для застосування у пивоварінні найбільш придатними є ферменти грибного походження (*A. oryzae*), що дозволяє заощадити десятки тисяч тонн ячменю. Якщо у виробництві пива зменшити кількість солоду і збільшити кількість ферментного препарату до 4–5%, то можна взагалі обійтися без солоду і з несолодженої сировини одержати сусло, яке майже не відрізнятиметься від сусла, виготовленого із солоду. Якщо затір у процесі такого способу виробництва піддати гідротермічній обробці певного режиму, то він набуває смаку й аромату солоду.

Амілолітичні ферменти також використовують у *крохмале-патоковій промисловості* для виготовлення глюкозної і мальтозної патоки [43]. У цьому разі застосування амілаз різноманітне. Насамперед, за їхньою участю може бути отримана розчинна форма крохмалю. За допомогою бактеріальних і рослинних амілаз вдається одержати мальтозну і глюкозну патоки, зокрема з кукурудзяного і маїсового борошна, а також чисту глюкозу. Різні види паток використовують головним чином у кондитерському виробництві, де вони перешкоджають кристалізації сахарози і лактози, поліпшують консистенцію виробів і збільшують терміни їх зберігання, а також у виробництві морозива, консервованих фруктів і варення, безалкогольних напоїв, столових сиропів тощо.

У крохмале-патоковій промисловості ферментативний гідроліз має переваги перед кислотним завдяки ряду переваг, таких як специфічність реакції, стабільність продуктів, нижчі енергетичні потреби [44].

У хлібопекарській промисловості амілолітичні ферментні препарати застосовують як біологічні поліпшувачі якості хліба: значно покращуються смак, аромат, забарвлення кірки, збільшується питомий об'єм, пористість, вміст цукру. Крім того, вони інтенсифікують біохімічні й мікробіологічні процеси, прискорюючи процес тістоведення. α-Амілазу *A. oryzae* додають у разі недостатнього вмісту амілаз у борошні. Амілаза гідролізує крохмаль тіста, а утворювана при цьому мальтоза слугує субстратом для пекарських дріжджів у процесі заквашування. Низька термостійкість α-амілази *A. oryzae* має позитивне значення, дозволяє уникнути деградації м'якуша у процесі випікання.

У виробництві різних виробів із круп'яних продуктів амілази застосовують для попереднього оброблення сировини, з якої виробляють харчовий продукт у вигляді пластівців чи зерен або круп'яних концентратів. Готові продукти після гідролізу набувають поліпшених смакових якостей, збагачуються розчинними цукрами, компоненти їх краще перетравлюються і засвоюються.

У виробництві овочепродуктів, зокрема пюре, супів, різних форм сушених овочів, крохмаль так само модифікують. Процес має ряд технологічних переваг: для супів і пюре — необхідне розрідження за збереження сухої речовини у продуктах; для сушених овочів — деяке прискорення процесу висушування. В усіх випадках повніше використовується сировина.

Відходи кондитерської промисловості часто містять значні кількості крохмалю, особливо це стосується відходів виробництва цукерок. За допомогою бактеріальних і грибних амілаз можна виділити з них цукри і використовувати їх.

Дитяча їжа. На сьогодні в деяких країнах налагоджено випуск нових харчових продуктів, які попередньо оброблені ферментами. Так, під час виготовлення дитячої їжі крохмаль чи білки частково гідролізують амілолітичними чи протеолітичними ферментами. Це значно полегшує перетравлення і засвоєння зазначених цінних речо-

вин в організмі дитини і, крім того, поліпшує смакову якість їжі, що в даному разі також є дуже важливим.

Вироби із фруктів. У виробництві різної продукції з фруктів — соків, екстрактів, деяких сортів варення, фруктових пюре — застосовують грибні амілази для повного розщеплення в них крохмалю. Залишки крохмалю можуть призводити до поступового загусання продуктів, деякого помутніння соків, екстрактів, погіршення їхнього товарного вигляду.

Амілази можна широко використовувати і в легкій промисловості [45]. Так, у *текстильному виробництві* їх застосовують для розшліхтування рослинного волокна перед відбілюванням і фарбуванням. Вихідний продукт — сувора тканина — містить 5% крохмалю і чимало інших домішок, які треба видалити, зробивши тим самим тканину м'якою, здатною змочуватися, краще відбілюватись і зафарбовуватись. Найпридатнішими для цієї мети виявилися бактеріальні амілази. Для фарбування текстильних виробів, навпаки, необхідним є крохмаль. Його вводять у друкувальну фарбу у вигляді загущувача, для того щоб надати фарбі клейкості, пластичності й чіткості. Крохмаль, що його використовують у цьому разі, має бути розчинним. Для цього його деякою мірою гідролізують за допомогою амілолітичних ферментів (краще бактеріального походження, утім можна й рослинного).

У паперовій промисловості за допомогою амілаз одержують спеціальний крохмаль, який додають під час проклеювання паперу. Ця операція додає паперу пружності, щільності, глянцю, збільшує його міцність.

Амілази використовують і в *промисловості очищення*. За їх участю готують розчинний крохмаль, який застосовують для підкрохмалювання білизни. І навпаки, очищуючи білизну й одяг, можна легко розщепити крохмальний шар і швидко видалити його разом із плямами. Під час ремонтних робіт за допомогою амілаз знімають зі стін шпалери, що були приклеєні крохмальним клейстером.

Амілази, разом із протеазами й ліпазами, широко використовують у виробництві *мийних засобів*. Амілази полегшують видалення плям, які містять крохмальні речовини, наприклад, від макаронних виробів, картоплі, шоколаду, дитячої їжі. Крохмаль, що висихає, важко видаляється при середніх і низьких температурах прання, особливо в разі застосування мийних засобів середньої лужності. Крохмаль прилипає до поверхні тканини, відіграючи роль клею для інших компонентів забруднень. Амілаза гідролізує крохмаль у декстрини і цукри, які легко розчиняються у мийному розчині.

Таким чином, у поданому огляді систематизовано наявні на цей час дані щодо фізико-хімічних і каталітичних властивостей бактеріальних та грибних α-амілаз, наведено результати молекулярних досліджень структури білка та безпосередньо активного центру ферменту, що, у свою чергу, дозволяє досить повно визначити положення α-амілаз у сучасній класифікації глікозидгідролаз.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Sivaramarkrishtan S., Gangadharan D., Kesavan Madhavan Nampoothiri et al.* α-Amylases from microbial sources an overview on recent developoments // Food Technol. Biotechnol. — 2006. — V. 44, N 2. — P. 173–184.
2. *Maarel M. J. E. C. van de, Veen B. van der, Uitdehaag J. C. M et al.* Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family//J. Biotechnol. — 2002. — V. 94. — P. 137–155.
3. *Takata H., Kuriki T., Okada S. et al.* Action of neopullulanase. Neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at α–(1,4)- and α-(1,6)-glucosidic linkages // J. Biol. Chem. — 1992. — V. 267. — P. 18447–18452.
4. *MacGregor E. A.* An overview of clan GH – H and distantly-related families // Biologia (Bratislava). — 2005. — V. 60. — P. 5–12.
5. *Kuriki T., Imanaka T.* The concept of the α-amylase family: structural stability and common catalytic mechanism // J. Biosci. Bioeng. — 1999. — V. 87. — P. 557–565.
6. *Janesek S.* How many conserved regions are there in the α-amylase family // Biologia (Bratislava). — 2002. — V. 11. — P. 29–41.
7. *Matsuura Y.* A possible mechanism of catalysis involving three essential residues in the enzymes of α-amylase family// Ibid. — 2002. — V. 11. — P. 21–27.
8. *Reddy N. S., Nimmagadda A., Rao S.* An overview of the microbial α-amylase family//African J. Biotechnology. — 2003. — V. 2, N 12. — P. 645–648.
9. *Dickmanns A., Ballschmiter M., Liebl W., Ficher R.* Structure of the novel α-amylase AmyC from Thermotoga maritima // Acta Cryst. — 2006. — V. 62. — P. 262–270.
10. *Галич И. П.* Хроматографическое исследование высокоочищенных препаратов микробных α-амилаз и некоторых других глобулярных белков: Автореф. дис. … канд. биол. наук: 093. — К., 1978. — 27 с.
11. *Квеситадзе Г. И., Коконашвили Г. Н., Фениксова Р. В.* α-Амилаза *Aspergillus oryzae* // Ферменты. — Тбилиси.: Мецниереба, 1975. — 115 с.

12. *Потехина Т. С.* Сорбционная иммобилизация микробных амилаз на карбоксильных и углеродных сорбентах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04. — Л., 1988. — 22 с.
13. *Фролова Г. М., Сильченко А. С., Пивкин М. В.* Амилолитические ферменты морского гриба *Aspergillus flavipes* // Биоактивные вещества из морских макроорганизмов и микроорганизмов и наземных растений Дальнего Востока: Материалы науч. конференции. — Владивосток, 2001. — С. 205–207.
14. *Шкуматов В. М., Рудой А. Л., Овсянко С. Л. и др.* Химические проблемы создания новых материалов и технологий. — М., 1988. — С. 549–558.
15. *Кичакова Н. А.* Выделение и изучение свойств термостабильной альфа-амилазы Bacillus sp. 86: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. — К., 1991. — 16 с.
16. *Damodara R., Purnima A., Ramesh D., Ayyanna C.* Purification of α-amylase from Bacillus licheniformis by chromatofocusing and gel filtration chromatography // World J. Microbiol. Biotechnol. — 2002. — V. 18, N 6. — P. 547–550.
17. *Перевозченко И. И.* Сравнительное исследование α-амилаз некоторых плесневых грибов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 093. — К., 1981. — 24 с.
18. *Фролова Г. М., Сильченко А. С., Пивкин М. В., Михайлов В. В.* Амилазы гриба *Aspergillus flavipes*, ассоциированного с *Fucus evanescens* // Прикл. биохим. микробиол. — 2002. — Т. 38, № 2. — С. 155–160.
19. *Mitidieri S., Martinelli A. H. S., Schrank A., Vainstein M. H.* Enzymatic detergent formulation containing amylase from Aspergillus niger: A comparative study with commercial detergent formulations//Bioresource Technology. — 2006. — V. 97, N10. — P. 1117–1224.
20. *Zeng G.-M., Shi J.-G., Yuan X.-Z., Liu J.* Effects of Tween 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of Penicillium simplicissium isolated from compost // Enzyme Microb. Technol. — 2006. — V. 39, N 7. — P. 1451–1456.
21. *Павлова И. Н., Кичакова Н. А., Захарова И. Я.* Термостабильные амилазы штамма *Bacillus sp.* // Методы получения, анализа и применения ферментов. — Рига, 1990. — С. 34.
22. *Saxena R. K., Dutt K., Agarwal L., Nayyar P.* A highly thermostable and alkaline amylase from a Bacillis sp. PN5 // Bioresource Technology. — 2007. — V. 98, N 2. — P. 260–265.
23. *Цурикова Н. В., Нефедова Л. И., Костилева Е. В. и др.* Получение активного штамма *Bacillus licheniformis* — продуцента термостабильной α-амилазы // Приклад. биохим. микробиол. — 2002. — Т. 38, № 5. — С. 502–508.
24. *Uyar F., Baysal Z., Dogru M.* Purification and some characterization of an extracellular α-amylase from a thermotolerant *Bacillus subtilis* // Ann. Microbiol. — 2003. — V. 53, N 3. — P. 315–322.
25. *Asgher M., Asad M. J., Rahman S. U., Legge R. L.* A thermostable α-amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for stach processing // J. of Food Engineering. — 2007. — V. 79, N 3. — P. 950–955.
26. *Castro G., Baigori M., Sinerir F.* Studies on α-amylase production by Bac. licheniformis MIR-61 // Acta Biotechnol. — 1999. — V. 19, N 3. — P. 263–272.
27. *Decklerck N., Machius M., Joyet Ph. et al.* Engeneering the thermostability of *B. licheniformis* α-amylase//Biologia (Bratislava). — 2002. — V.11. — P. 203–211.
28. *Saboury A. A.* Stability, activity and binding properties study of α-amylase upon interaction with Ca^{2+} and Co^{2+} //Ibid. — 2002. — V. 11. — P. 221–228.
29. *Kumar J. P., Richa J., Jain P. C.* Production of industrially important enzymes by some actinomycetes producing antifungal components // Hindustan Antibiot. Bull. — 2003–2004. — V. 45–46. — C. 29–33.
30. *Sabathe F., Croux C., Comillot E., Soucaille P.* AmyP, a receptor gene for study strain degeneration in Clostridium acetobutyricum ATCC 824//FEMS Microbiol. Letters. — 2002. — V. 210, N 2. — P. 93–98.
31. *Poli A., Esposito E., Lama L., Orlando P.* Anoxybacillus amyloliticus sp. novo., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from mount Rittmann (Antarctica) // System. App. Microbiol. — 2006. — V. 29, N 4. — P. 300–307.
32. *Ezeji T. C., Bahl H.* Purification, characterization, and synergistic action of phytate-resistant α-amylase and α-glucosidase from Geobacillus thermodinitrificans HRO10 // J. Biotechnol. — 2006. — V. 125, N 1. — P. 27–38.
33. *Coronado M., Vargas C., Hofemeister J., Nieto J.* Production and biochemical characterization of an α-amylase from the moderate halophile Halomonas meridiana // FEMS Microbiol. Lett. — 2000. — V. 183,N1. — P. 67–71.
34. *Leveque E., Janecek S., Haye B., Belarbi A.* Thermophilic archaeal amylolytic enzymes // Enzyme Microb. Technol. — 2000. — V. 26,N1. — P. 3–14.
35. *Odibo F., Ulbrieh-Hofmann R.* Thermostable α-amylase and glucoamylase from Thermomyces lanuginosus F_1 // Acta biotechnol. — 2001. — V. 21, N 2. — P. 141–153.
36. *Пронин С. И.* Амилолитические ферменты и их роль в пищевой промышленности. — М.: Гизлегпищепром, 1953. — С. 5–12.
37. *Gupta R., Gigras P., Mohapatra H. et al.* Microbial α-amylases. A biotechnological perspective // Process Biochem. — 2003. — V. 38. — P. 1599–1616.
38. *Ортенберг Э. Ш., Парр Г. С., Столыпин О. С. и др.* α-Амилаза медицинского назначения // Методы получения, анализа и применения ферментов. –Рига, 1990. — С. 171–177.
39. *Лупова Л. М.* Косметика — новая область использования ферментных препаратов. — М., 1977. — 36 с.

40. *Авиженис В. Ю.* Создание технологии производства новых ферментных препаратов для сельского хозяйства и пищевой промышленности: Автореф. дис. ... докт. техн. наук: 05.18.10. — М., 1992. — 70 с.
41. *Устинников Б. А., Цурикова Н. В., Иванов В. В., Воронцова Н. Н.* Промышленное культивирование *Bacillus subtilis-82* — продуцента α-амилазы и *Asp. awamori* ВУДТ-2 — продуцента глюкоамилазы для применения в пищевой биотехнологии // Биосинтез ферментов микроорганизмами. — Ташкент: Фан, 1988. — С. 154.
42. *Люджус Л. Л., Чекменева Т. М., Куниский Д. Г.* Состояние производства и применение ферментов за рубежом. — М., 1986. — С. 6–8.
43. *Рухлядева А. П., Полыгалина Г. В.* Методы определения активности гидролитических ферментов. — М.: Легпищпром, 1981. — С. 34–43.
44. *Satyanarayana N., Rao J., Ezhilvannan M.* α-Amylases // Enzyme Technology / Eds. A. Pandey, C. Webb, C. Soccol, C. Larroche. — New Delhi: Asiatech Publishers Inc., 2005. — P. 189–220.
45. *Riegal E. R., Bissinger H. G.* Industrial fermentation: Principles, Processes and Products // Riegal's Handbook of Industrial Chemistry. — New York: Kluver Academic Publishres, 2002. — P. 963–1045.

МИКРОБНЫЕ α-АМИЛАЗЫ: ВЫДЕЛЕНИЕ, СВОЙСТВА, ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Л. Д. Варбанец, Е. В. Авдиюк, Н. В. Борзова

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

α-Амилазы представляют одно из наибольших семейств гликозидгидролаз, трансфераз и изомераз, входящих в клан GH–H. Ферменты этого семейства наряду α-1,4-, α-1,6-связями способны гидролизовать α-1,1-, α-1,2-, α-1,3, α-1,5-гликозидные связи, содержат 4 незаменимых остатка аминокислот (Asp204, Asp206, Glu230, Asp297) и характеризуются $(\beta/\alpha)_8$ или TIM-barrel каталитическим доменом. Обсуждаются вопросы, касающиеся методов выделения и очистки α-амилаз, которые включают осаждение органическими растворителями и нейтральными солями, диализ, ультрафильтрацию, гель-фильтрацию, хроматографию, электрофорез. Приведены современные данные относительно возможности продуцирования α-амилаз микроорганизмами разных таксономических групп, в частности бактерий, микромицетов. Детально обсуждаются физико-химические свойства α-амилаз, их pH- и термооптимумы, pH- и термостабильность, молекулярные массы, влияние ионов металлов и различных химических реагентов. Рассматривается возможность использования α-амилаз в разных отраслях промышленности (спиртовой, крахмально-патоковой, хлебопекарской, кондитерской, текстильной, бумажной и др.), а также в медицине.

Ключевые слова: микробные α-амилазы, физико-химические свойства, практическое использование.

MICROBIAL α-AMYLASES: ISOLATION, PURIFICATION AND PRACTICAL USAGE

L. D. Varbanets, K. V. Avdiyuk, N. V. Borzova

Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

The a-amylase family is the largest family of glycoside hydrolases, transferases and isomerases, comprising in clan GH–H. The enzymes of this family, except of α-1,4-, α-1,6-bonds, are able to hydrolyse α-1,1-, α-1,2-, α-1,3-, α-1,5-glycosidic bonds, contain 4 conserved aminoacid residues (Asp204, Asp206, Glu230 и Asp297) and have $(\beta/\alpha)_8$ or TIM barrel catalytic domain. The questions conserning methods of isolation and purification of α-amylases, which include the precipitation of organic solvents and neutral salts, dialysis, ultrafiltration, gel-filtration, chromatography, electrophoresis are discussed. The current data on possibility of α-amylases from different taxonomic groups of microorganisms, in particular, bacteria and micromycetes are given. Physico-chemical properties of α-amylases, its pH- and thermo-optimum, pH- and thermostability, molecular masses, influence of metal ions and different chemical reagents are discussed in detail. It's shown the possibility of α-amylases usage in different branches of industry — food, detergent, paper, textile, pharmaceutical.

Key words: microbial α-amylases, physico-chemical properties, practical usage.