

**К.В. Авдіюк<sup>1</sup>, Л.Д. Варбанець<sup>1</sup>, П.П. Зелена<sup>2</sup>, В.В. Шепелевич<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
буль. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

<sup>2</sup>Київський національний університет ім. Тараса Шевченка,  
просп. Глушкова, 2, Київ, 03022, Україна

## **ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ $\alpha$ -АМІЛАЗИ *ACHROMOBACTER SP. 7a***

З *Achromobacter sp. 7a*, виділеної з Чорного моря, акваторії о. Зміїний, отримано фермент з  $\alpha$ -амілазною активністю, який також здатний розщеплювати синтетичні субстрати: *p*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-глюкопіранозид та *p*-нітрофеніл- $\alpha$ - і - $\beta$ -D-ксилопіранозид. Були підібрані методи виділення і очистки ензиму, які включали: осадження сульфатом амонію і афінну сорбцію на крохмалі, що сприяло підвищенню активності у 7 разів порівняно з активністю у супернатанті культуральної рідини.  $\alpha$ -Амілаза виявляла максимальну активність при рН 7,0 і 11,0 та за температури 50 °С. Фермент залишався повністю стабільним протягом 24 год у діапазоні рН від 7,0 до 12,0, протягом 3 год за температури 37 °С і 50 °С при рН<sub>опт</sub> 7,0, а також зберігав 87,5 % та 75 % вихідної активності через 3 год. інкубування за температури 37 °С і 50 °С відповідно, при рН<sub>опт</sub> 11,0. Показано, що додавання стабілізуючих агентів (іони кальцію, хлорид натрію) не захищало фермент від термоінактивації (60 °С, 70 °С).

*Ключові слова:*  $\alpha$ -амілаза, фізико-хімічні властивості, афінна сорбція.

Родина  $\alpha$ -амілаз (GH13) включає ферменти, які здійснюють гідроліз внутрішніх  $\alpha$ -1,4-глікозидних зв'язків у крохмалі, глікогені та споріднених полісахаридах, з утворенням олігосахаридів і декстринів різної молекулярної маси [16]. Завдяки широкому спектру їх потенційного використання, вони є одними з найважливіших ферментів у сучасній біотехнології та охоплюють біля 30 % світового виробництва ензимів [16, 18]. Цікаво, що першим ферментом, який почали промислово виробляти (1894 р.), була амілаза, виділена з грибного продуцента, яка застосовувалася як добавка для покращення травлення [10]. На сьогодні  $\alpha$ -амілази використовуються головним чином у процесах переробки крохмалю, на одному з етапів отримання біопалива, у пивоварінні, хлібопеченні, крохмале-патоковому, паперовому, текстильному, спиртовому виробництвах, у медицині, аналітичній хімії та як один з компонентів при виготовленні мийних засобів [1, 13, 16]. Однак різні галузі промисловості потребують ферментів з різними фізико-хімічними властивостями, які були б активними як у кислій (крохмале-патокова промисловість), так і в лужній (виготовлення детергентів) області рН, термостабільними (високотемпературні процеси розрідження крохмалю) і термолабільними (хлібопечення) [1]. Тому метою роботи було виділити, очистити і дослідити фізико-хімічні властивості  $\alpha$ -амілази, виділеної з морської бактерії *Achromobacter sp. 7a*.

**Матеріали і методи.** Об'єктом дослідження була позаклітинна  $\alpha$ -амілаза, отримана з морської бактерії *Achromobacter sp. 7a*, що була виділена з Чорного моря, акваторії о. Зміїний, яку люб'язно надав Іваниця В.О.

Культивування продуценту проводили на рідкому поживному середовищі Чапека з крохмалем наступного складу (г/л): NaNO<sub>3</sub> – 2,0;

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,0;  $\text{KCl}$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,015; нерозчинний картопляний крохмаль – 20,0;  $\text{H}_2\text{O}$  – до 1,0 л; рН 6,0, в колбах Ерленмейера (0,75 л) зі 100 мл поживного середовища при інтенсивності перемішування 220 об/хв та за температури 24 °С протягом 3 діб. Біомасу відділяли центрифугуванням при 5000 g, 30 хв. У супернатанті культуральної рідини (СКР) визначали вміст білка і  $\alpha$ -амілазну активність.

Виділення і очистка  $\alpha$ -амілази включали осадження сульфатом амонію 90 %-го насичення і метод афінної сорбції на крохмалі, як описано у роботі [2]. Питома активність очищеного препарату  $\alpha$ -амілази складала 3,0 од/мг білка.

Активність  $\alpha$ -амілази визначали йодометричним методом відповідно ГОСТу 20264.4-89 [3], протеолітичну активність – методом Ансона у модифікації Петрової [4], вміст білка – методом Lowry et al [3].

Визначення глікозидазних активностей ( $\alpha$ - і  $\beta$ -глюкозидазної,  $\alpha$ - і  $\beta$ -галактозидазної,  $\alpha$ - і  $\beta$ -ксилозидазної,  $\alpha$ -манозидазної,  $\alpha$ -фукозидазної,  $\beta$ -N-ацетилглюкозаміназної,  $\alpha$ -рамнозидазної,  $\beta$ -глюкуронидазної) проводили, використовуючи відповідні синтетичні субстрати: *n*-нітрофеніл- $\alpha$ - і - $\beta$ -D-глюкопіранозид, *n*-нітрофеніл- $\alpha$ - і - $\beta$ -D-галактопіранозид, *n*-нітрофеніл- $\alpha$ - і - $\beta$ -D-ксилопіранозид, *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-манопіранозид, *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-фукопіранозид, *n*-нітрофеніл-N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінід, *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-рамнопіранозид, *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкуронід (“Sigma”, США), як описано у роботі [2].

Дослідження впливу температури і рН на активність  $\alpha$ -амілази проводили в інтервалі температур від 4 °С до 100 °С і рН 3,0–12,0 з використанням 0,05 М універсального буферного розчину і гліцинового буферу. Термостабільність препаратів визначали за температури 37 °С, 50 °С, 60 °С і 70 °С, відбираючи аліквоти через 15, 30, 60, 120, 180 хв інкубування ферменту за відповідної температури. рН-Стабільність вивчали, витримуючи суміш ферментного препарату з відповідним буфером і відбираючи проби для визначення активності через певні проміжки часу (15, 30, 60, 120, 180 і 1440 хв).

Аналіз одержаних результатів проводили шляхом їх статистичної обробки, вираховуючи середні значення величин і стандартні похибки ( $M \pm m$ ) [3]. Значення при  $P < 0,05$  розглядали як достовірні.

**Результати та їх обговорення.** У результаті скринінгу, проведеного серед 25 морських культур, виділених з Чорного моря, акваторії о. Зміїний, було відібрано одну – *Achromobacter* sp. 7a, яка при вирощуванні на поживному середовищі Чапека з 2 %-им крохмалем синтезувала фермент з  $\alpha$ -амілазною активністю. У СКР даного продуцента з використанням *n*-нітрофенільних субстратів, крім  $\alpha$ -амілазної, також були виявлені  $\alpha$ -D-глюкозидазна та  $\alpha$ - і - $\beta$ -D-ксилозидазна активності (табл. 1).

Оскільки різні галузі промисловості потребують ферментів як різного ступеня чистоти, так і ензимів з різними властивостями, необхідною умовою роботи було отримання ферментів в очищеному стані та дослідження їх фізико-хімічних властивостей.

Для виділення  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a із СКР застосовували осадження сульфатом амонію 90 %-го насичення. Даний метод зазвичай сприяє підвищенню ступеня питомої  $\alpha$ -амілазної активності ферменту [2], однак у випадку дослідженого ензиму спостерігалось лише його кон-

центрування (табл. 1). Подібне явище характерне також для  $\alpha$ -амілази з *Bacillus* sp. BKL20 [14] і *Bacillus megaterium* [15].

Подальша схема очистки ферменту *Achromobacter* sp. 7a включала застосування простого і легкого у використанні методу афінної сорбції на нерозчинному картопляному крохмалі. Перевагою вищезазначеного методу є можливість отримання високоочищеного ферменту за один етап [2]. Відомо, що ензим здатний специфічно зв'язуватись з сорбентом лише за низьких температур (0–4 °C), у той час як процес десорбції відбувається за умов підвищених температур (20–50 °C). З метою покращення ефективності зняття ферменту з носія, додатково використовують також 2 %-ві розчини мальтози, глюкози або декстрину [2]. Було показано, що найбільш ефективним серед вищеперерахованих елюантів виявився 2 %-ий розчин мальтози з нагріванням до 40 °C, застосування якого сприяло 5-разовій очистці  $\alpha$ -амілази (3,0 од/мг білка) порівняно з її активністю у діалізаті препарату, отриманого 90 %-им осадженням сульфатом амонію (рис. 1). Крім того, на даному етапі очистки вдалося повністю позбутися супутніх активностей:  $\alpha$ -D-глюкозидазної та  $\alpha$ - і  $\beta$ -D-ксилозидазної (табл. 1).

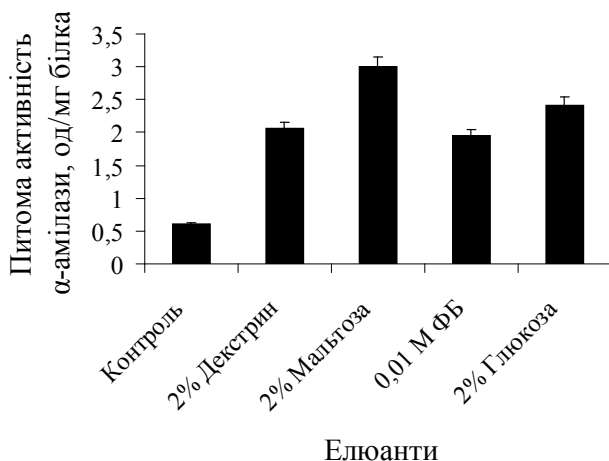
Таким чином, афінна сорбція на крохмалі дозволила підвищити питому активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a у 7 разів порівняно з її активністю у СКР.

Подальша робота стосувалася вивчення фізико-хімічних властивостей очищеної  $\alpha$ -амілази.

Відомо, що більшість  $\alpha$ -амілаз мікробного походження виявляють максимальну активність за слабко-кислих та нейтральних значень рН [1], хоча зустрічаються ацидо- [1] і алкалофільні ензими [14].

Для визначення рН-оптимуму дії очищеної  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a використовували 0,05 М універсальний буферний розчин у діапазоні рН від 3,0 до 12,0 (рис. 2).

Показано, що  $\alpha$ -амілаза *Achromobacter* sp. 7a була активною в широкому діапазоні рН від 6,0 до 12,0 з оптимальними значеннями рН 7,0 і 11,0. Наявність декількох рН-оптимумів не є унікальною властивістю дослі-



**Рис. 1.** Вплив різних сполук на десорбцію  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a

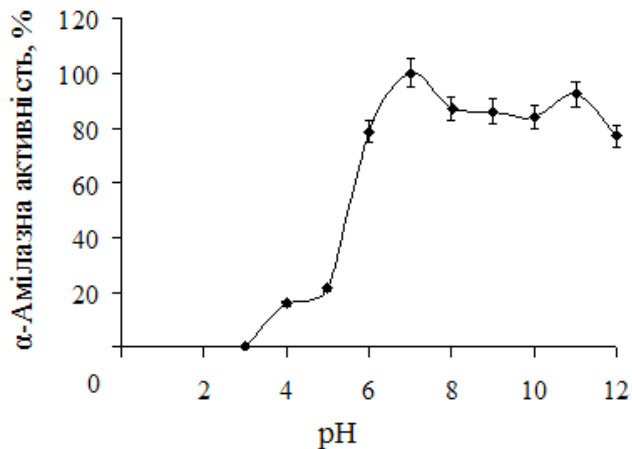
Примітка: Контроль – діалізат препарату, отриманого 90 %-им осадженням сульфатом амонію; ФБ – фосфатний буфер.

Таблиця 1

Спектр глікозидазних і протеолітичної активностей у препараті  
 $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a (M  $\pm$  m, n=5)

Препарат	Питома активність, од/мг білка:												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
СКР	0,0650 $\pm$ 0,0025	0	0	0	0	0	0	0,026 $\pm$ 0,0010	0,032 $\pm$ 0,0015	0	0	0	0,430 $\pm$ $\pm$ 0,015
Активність після 90 % насичення (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,0040 $\pm$ 0,0021	0	0	0	0	0	0	0,0018 $\pm$ 0,0008	0,0021 $\pm$ 0,0010	0	0	0	0,230 $\pm$ $\pm$ 0,010
Активність після афінної сорбції	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,0 $\pm$ $\pm$ 0,14

Примітка: 1 –  $\alpha$ -D-глюкозидазна активність, 2 –  $\beta$ -D-глюкозидазна активність; 3 –  $\alpha$ -D-галактозидазна активність, 4 –  $\beta$ -D-галактозидазна активність; 5 –  $\alpha$ -L-фукозидазна активність; 6 – N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінідазна активність; 7 –  $\alpha$ -D-манозидазна активність; 8 –  $\alpha$ -D-ксилозидазна активність; 9 –  $\beta$ -D-ксилозидазна активність; 10 –  $\alpha$ -D-рамнозидазна активність, 11 –  $\beta$ -D-глюкуронідазна активність; 12 – протеолітична активність; 13 –  $\alpha$ -амілазна активність.

Рис. 2. pH-Оптимум  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a

дженого ферменту, подібне явище характерне також для  $\alpha$ -амілази *Bacillus* sp. L1711, яка виявляла максимальну активність при pH 7,0-7,5 і 9,5-10,0 та була активною у діапазоні pH від 6,0 до 11,0 [9] та  $\alpha$ -амілази *Bacillus* sp. A3-15, яка також мала два оптимуми pH при 7,5-8,0 і 11,0 [5]. Крім того,  $\alpha$ -амілаза *Bacillus* sp. VKL20 виявляла високу активність у широкому спектрі значень pH від 6,0 до 11,0 [15], а  $\alpha$ -амілази з *B. subtilis* KIBGE HAS і *B. amyloliquefaciens* ABBD – при pH 7,5 і 7,0 відповідно [8, 17].

Оскільки будь-які промислові процеси є тривалими в часі, то для  $\alpha$ -амілаз, перспективних для практичного використання, надзвичайно важливим є не лише виявлення активності за екстремальних значень pH, але й її збереження за цих умов. Вивчення pH-стабільності ферментних препаратів досліджуваної  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a свідчить, що після 24 год інкубації (при 20 °C) спостерігалось не лише повне збереження їх активності, але й її підвищення від 129 до 240 % за значень pH у межах від 7,0 до

12,0 (рис. 3). Подібне явище активації ферменту через 24 год інкубування при різних значеннях рН було характерним також для  $\alpha$ -амілази *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147 [2]. Але механізм цієї дії поки що нами не з'ясовано.  $\alpha$ -Амілаза *Bacillus* sp. ВКЛ20 [15] також зберігала 100 % вихідної активності в діапазоні рН від 7,0 до 11,0 протягом 24 год інкубування. У той же час  $\alpha$ -амілаза *Bacillus* sp. АЗ-15 була менш стабільною, оскільки проявляла лише 75 %, 67 %, і 65 % початкової активності при рН 9,0, 10,0 і 11,0 відповідно, після 24 год інкубування [5].

Таким чином, досліджуваний нами препарат  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a був активним у слабко-кислих, нейтральних і лужних значеннях рН.

Термостабільність  $\alpha$ -амілази є критично важливою характеристикою для її можливого практичного використання, оскільки окремі стадії промислових процесів проводять в умовах підвищених температур. При визначенні температурного оптимуму дії показано (рис. 4), що  $\alpha$ -амілаза *Achromobacter* sp. 7a, при оптимальних значеннях рН 7,0 і 11,0, виявляла максимальну активність за температури 50 °С.

Ці результати узгоджуються з даними, отриманими іншими авторами для  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* KIBGE HAS [8], яка виявляла максимальну активність при 50 °С,  $\alpha$ -амілази *Bacillus* sp. АВ68 [6], *Bacillus* sp. L1711 [9] і *B. subtilis* А10 [7] з термооптимумами при 50 °С, 55 °С і 45 °С відповідно.

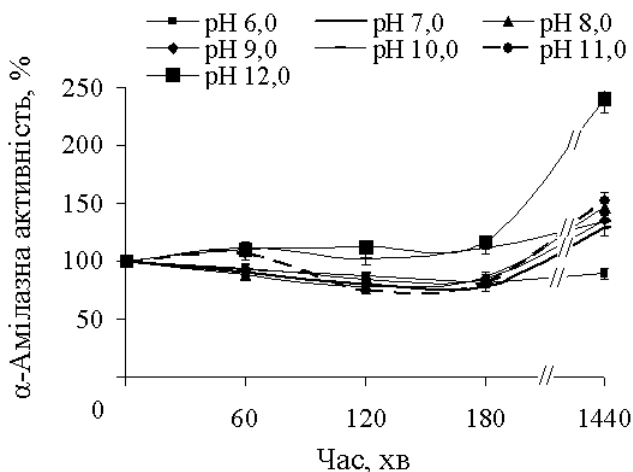


Рис. 3. рН-стабільність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a

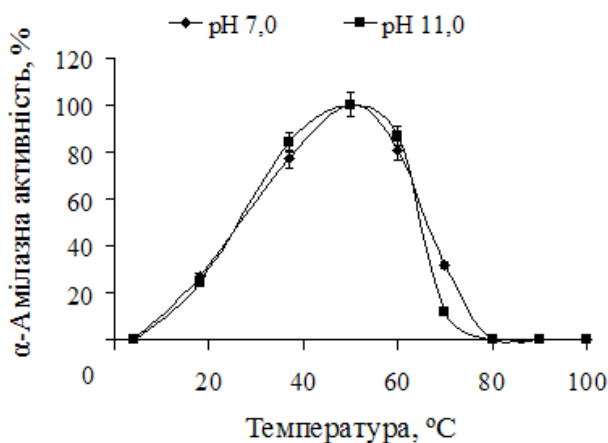


Рис. 4. Термооптимум  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a за оптимальних значень рН

При визначенні термостабільності показано, що  $\alpha$ -амілаза *Achromobacter* sp. 7a з рН-оптимумом 7,0 виявилася повністю стабільною протягом 3 год за температури 37 °С і 50 °С та зберігала 20 % вихідної активності за температури 60 °С через 15 хв інкубування (рис. 5, 6, 7). У той же час  $\alpha$ -амілаза *Achromobacter* sp. 7a з рН-оптимумом 11,0 була більш чутливою до температури, оскільки виявляла 87,5 % і 75 % початкової активності за температури 37 °С і 50 °С через 3 год інкубації відповідно, однак за температури 60 °С, вона зберігала 60 % початкової активності через 15 хв інкубування (рис. 5, 6, 8).

Подібні результати були отримані й іншими дослідниками. Так,  $\alpha$ -амілаза *Bacillus* sp. L1711 через 30 хв інкубування за температури 50 °С зберігала 91,5 % вихідної активності [9].  $\alpha$ -Амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 за температури 37 °С протягом 3 год інкубування зберігала 100 % своєї активності, при 50 °С – 72 %, за оптимальної температури 60 °С вже через 30 хв активність ензиму знижувалася до рівня 22 % [2].

З літературних даних відомо, що термостабільність ферменту можна підвищити внесенням до реакційної суміші стабілізуючих агентів, таких як іони кальцію, хлорид натрію, а також крохмаль [8, 9, 11, 12]. Іони кальцію здатні виступати стабілізаторами і активаторами  $\alpha$ -амілаз. Більшість

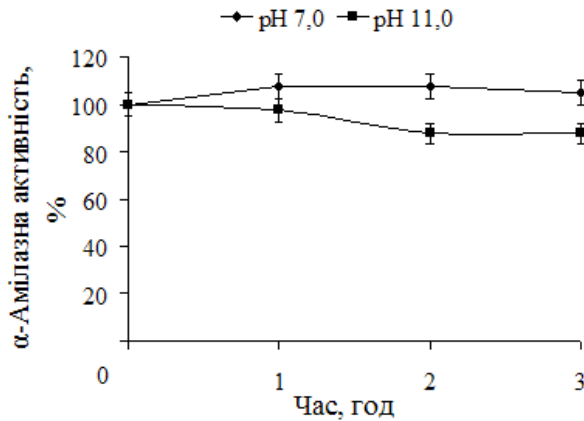


Рис. 5. Термостабільність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a при 37 °С за оптимальних значень рН

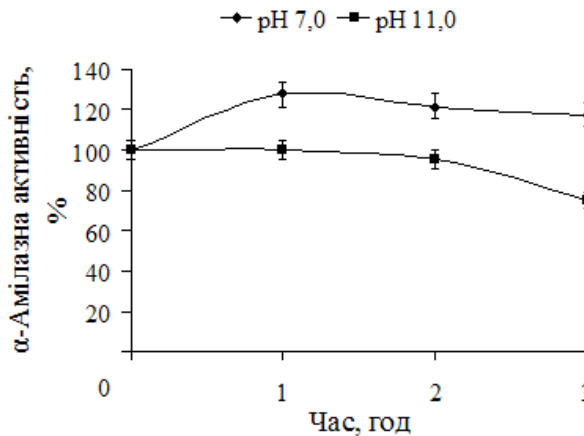


Рис. 6. Термостабільність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a при 50 °С за оптимальних значень рН

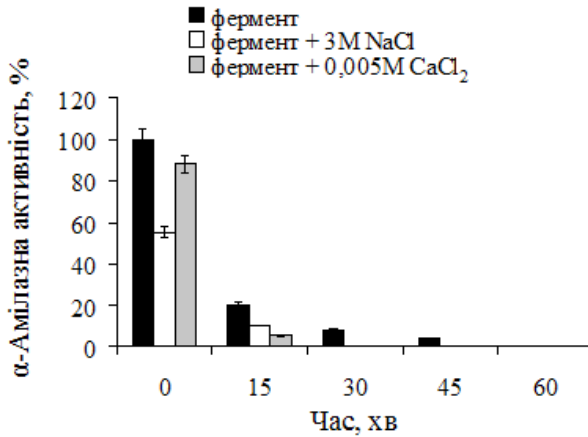


Рис. 7. Термостабільність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a при 60 °C за оптимального значення рН 7,0

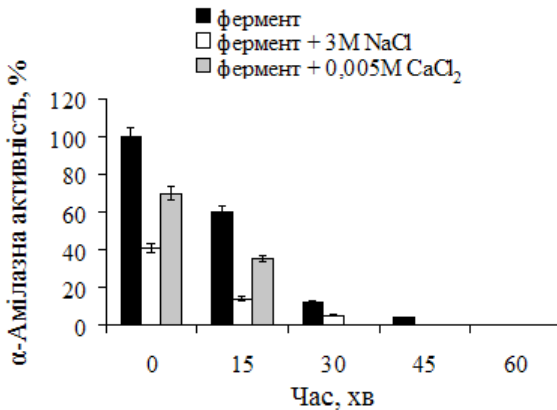


Рис. 8. Термостабільність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a при 60 °C за оптимального значення рН 11,0

дослідників пояснюють факт підвищення термостабільності ферменту у присутності іонів кальцію за рахунок формування Ca-Na-Ca тріади металів у головному центрі зв'язування кальцію [1, 12].

Внесення іонів кальцію і хлориду натрію до реакційної суміші, що містила досліджувану  $\alpha$ -амілазу *Achromobacter* sp. 7a, не призводило до підвищення термостабільності даного ферменту (рис. 7, 8). Подібне явище спостерігали при вивченні  $\alpha$ -амілази *Bacillus* sp. L1711 [9],  $\alpha$ -амілази *Bacillus* sp. AB68 [6],  $\alpha$ -амілази *Geobacillus thermoleovorans* [19],  $\alpha$ -амілази *Talaromyces pinophilus* [21] та ін.

Таким чином, вперше з *Achromobacter* sp. 7a було виділено фермент з  $\alpha$ -амілазною активністю, підібрано метод очистки та досліджено його фізико-хімічні властивості. Показано, що  $\alpha$ -амілаза *Achromobacter* sp. 7a, хоч і виявляє максимальну активність за 50 °C, однак здатна зберігати активність і стабільність у широкому діапазоні значень рН, а її активність не залежить від присутності іонів кальцію, що є безумовною перевагою дослідженого ферменту. Остання властивість є надзвичайно цінною, оскільки використання іонів кальцію у промислових умовах ускладнює процес одержання цільового продукту за рахунок залучення ще однієї стадії очистки [20]. Отже, досліджений нами фермент є конкурентоспро-

можним з раніше описаними  $\alpha$ -амілазами, хоча порівняти їх досить важко, оскільки різні дослідники користуються різноманітними методиками для визначення активності  $\alpha$ -амілази: метод із залученням динітросалцилової кислоти, йодометричний метод та ін.

Висловлюємо подяку д.б.н., проф. Іваниці В.О. (зав. кафедрою мікробіології, вірусології та біотехнології) за надану для досліджень культуру мікроорганізмів.

**Е.В. Авдюк<sup>1</sup>, Л.Д. Варбанец<sup>1</sup>, П.П. Зелёная<sup>2</sup>, В.В. Шепелевич<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

<sup>2</sup>Киевский национальный университет им. Тараса Шевченка,  
просп. Глушкова, 2, Киев, 03022, Украина

### **ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА $\alpha$ -АМИЛАЗЫ *ACHROMOBACTER SP.***

#### **Р е з ю м е**

Из *Achromobacter sp.* 7a, выделенной из Чёрного моря, акватории о. Змеиный, получен фермент с  $\alpha$ -амилазной активностью, который также способен расщеплять синтетические субстраты: п-нитрофенил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид и п-нитрофенил- $\alpha$ - и - $\beta$ -D-ксилопиранозид. Были подобраны методы выделения и очистки энзима, которые включали: осаждение сульфатом аммония и аффинную сорбцию на крахмале, что способствовало повышению активности в 7 раз по сравнению с активностью в супернатанте культуральной жидкости.  $\alpha$ -Амилаза проявляла максимальную активность при pH 7,0 и 11,0 и температуре 50 °C. Фермент оставался полностью стабильным в течение 24 часов в диапазоне pH от 7,0 до 12,0, в течение 3 часов при температуре 37 °C и 50 °C при pH<sub>опт</sub> 7,0, а также сохранял 87,5 % и 75 % исходной активности через 3 часа инкубирования при температуре 37 °C и 50 °C соответственно, при pH<sub>опт</sub> 11,0. Показано, что добавление стабилизирующих агентов (ионы кальция, хлорид натрия) не защищало фермент от термоинактивации (60 °C, 70 °C).

**К л ю ч е в ы е с л о в а:**  $\alpha$ -амилаза, физико-химические свойства, аффинная сорбция.

**K.V. Avdiyuk<sup>1</sup>, L.D. Varbanets<sup>1</sup>, P.P. Zelena<sup>2</sup>, V.V. Shepelevich<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine,  
154 Zabolotno St., Kyiv, 03143, Ukraine

<sup>2</sup>Taras Shevchenko Kyiv National University, 2 Hlushkova Ave., Kyiv, 03022, Ukraine

### **PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF *ACHROMOBACTER SP.* $\alpha$ -AMYLASE**

#### **S u m m a r y**

From *Achromobacter sp.* 7a, that was isolated with Black sea, aquatoria of island Zmiynyi, was isolated enzyme with  $\alpha$ -amylase activity, that able also to split the synthetic substrates: p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside and p-nitrophenyl- $\alpha$ , - $\beta$ -D-xylopyranoside. Methods of isolation and purification of enzyme were selected which included: ammonium sulfate precipitation and affinity sorption on starch, that improved enzyme activity in 7 times in comparison with activity in the supernatant of cultural liquid.  $\alpha$ -Amylase showed



maximal activity at pH 7.0 and 11.0 and to the temperature 50 °C. Enzyme remained fully stable during 24 hours in the range of pH from 7.0 to 12.0, during 3 hours at a temperature 37 °C and 50 °C at pHopt 7.0, and also 87.5 % and 75 % of initial activity saved during 3 h of incubation at a temperature 37 °C and 50 °C at pHopt 11.0 respectively. It is shown that addition of antihunt agents (ions of calcium, chloride of natrium) did not protect an enzyme from thermoinactivation (60 °C, 70 °C).

**К е у w o r d s:**  $\alpha$ -amylase, physico-chemical properties, affinity sorption.

1. Авдіюк К.В. Мікробні  $\alpha$ -амілази: фізико-хімічні властивості, субстратна специфічність та доменна організація // Укр. біохім. журн. – 2013. – **85**, № 4. – С. 5–19.
2. Авдіюк Е.В., Варбанець Л.Д., Сафронова Л.А., Харкевич Е.С. Очистка  $\alpha$ -амілаз *Aspergillus flavus* var. *oryzae* и *Bacillus subtilis* и их свойства // Біотехнологія. – 2012. – **5**, № 5. – С. 91–99.
3. Варбанець Л.Д., Борзова Н.В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. – Київ: Наук. думка, 2010.–440 с.
4. Петрова И.С. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения // Прикл. биохим. и микробиол. – 1966. – **2**, № 1. – С. 322–327.
5. Arikian B. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15 // Bioresource Technol. – 2008. – **99**, N 8. – P. 3071–3076.
6. Aygan A., Arikian B., Korkmaz H., Dinçer S., Çolak Ö. Highly thermostable and alkaline  $\alpha$ -amylase from a halotolerant-alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68 // Braz. J. Microbiol. – 2008. – **39**, N 3. – P. 547–553.
7. Aygan A., Sariturk S., Kostekci S., Tanis H. Production and characterization of alkaliphilic alpha-amylase from *Bacillus subtilis* A10 isolated from soils of Kahramanmaraş, Turkey // Afr. J. Microbiol. Res. – 2014. – **8**, N 21. – P. 2168–2173.
8. Bano S., Ul Qader S.A., Aman A., Syed M.N., Azhar A. Purification and characterization of a novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS // AAPS Pharm. Sci. Tech. – 2011. – **12**, N 1. – P. 255–261.
9. Bernhardsdotter Eva C.M.J., Joseph D. Ng., Owen K. Garriott, Marc L. Pusey Enzymic properties of an alkaline chelator-resistant  $\alpha$ -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate L1711 // Process Biochem. – 2005. – **40**, N 7. – P. 2401–2408.
10. Das S., Singh S., Sharma V., Soni M.L. Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme // Int. J. Pharm. Sci. – 2011. – **2**, N 1. – P. 486 – 496.
11. Gangadharan D., Nampoothiri K.M., Sivaramakrishnan S., Pandey A. Biochemical characterization of raw-starch-digesting alpha amylase purified from *Bacillus amyloliquefaciens* // Appl. Biochem. Biotech. – 2008. – **158**, N 3. – P. 653–662.
12. Hmidet N., Maalej H., Haddar A., Nasri M. A novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus mojavensis* A21: purification and biochemical characterization // Appl. Biochem. Biotech. – 2010. – **162**, N 4. – P. 1018–1030.
13. Hussain I., Siddique F., Mahmood M.S., Ahmed S.I. A review of the microbiological aspect of  $\alpha$ -amylase production // Int. J. Agr. Biol. – 2013. – **15**, N 5. – P.1029–1034.
14. Khan J.A., Briscoe S. A study on partial purification and characterization of extracellular alkaline amylases from *Bacillus megaterium* by solid state fermentation // Int. J. Appl. Biol. Pharm. Tech. – 2011. – **2**, N 3. – P. 37–46.

15. Kubrak O.I., Storey J.M., Storey K.B., Lushchak V.I. Production and properties of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. BKL20 // Can. J. Microbiol. – 2010. – **56**. – P. 279–288.
16. Mojsov K. Microbial  $\alpha$ -amylases and their industrial applications: a review // Int. J. Manag. IT Eng. – 2012. – **2**, N 10. – P. 583–609.
17. Nurachman Z., Kono A., Radjasa O.K., Natalia D. Identification a novel raw-starch-degrading  $\alpha$ -amylase from a tropical marine bacterium // Am. J. Biochem. Biotech. – 2010. – **6**, N 4. – P. 300–306.
18. Souza P.M., Magalhaes P.O. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry – a review // Braz. J. Microbiol. – 2010. – **41**, N 4. – P. 850–861.
19. Uma Maheswar Rao J.L., Satyanarayana T. Hyperthermostable,  $\text{Ca}^{2+}$ -independent and high maltose-forming  $\alpha$ -amylase production by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*: whole cell immobilization // Appl. Biochem. Biotech. – 2009. – **159**, N 2. – P. 464–477.
20. Uma Maheswar Rao J.L., Satyanarayana T. Improving production of hyperthermostable and high maltose-forming  $\alpha$ -amylase by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology and its applications // Biore-source Technol. – 2007. – **98**. – P. 345–352.
21. 18. Xian L., Wang F., Luo X., Feng Y.-L., Feng J.-X. Purification and characterization of a highly efficient calcium-independent  $\alpha$ -amylase from *Talaromyces pinophilus* 1-95 // Plos One. – 2015. – **10**, N 3. – P. e0121531.

Отримано 07.09.2015