

# МІКРОБНІ $\alpha$ -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

$\alpha$ -Амілази — одна з найбільших родин глікозидгідролаз, трансфераз та ізомераз, що належать до клану GH-N. Ферменти цієї родини окрім  $\alpha$ -1,4-,  $\alpha$ -1,6-зв'язків здатні гідролізувати  $\alpha$ -1,1-,  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3-,  $\alpha$ -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  $\alpha$ -амілаз, які охоплюють осадження органічними розчинниками і нейтральними солями, діаліз, ультрафільтрацію, гель-фільтрацію, хроматографію, електрофорез тощо. Наведено сучасні дані щодо можливості продукування  $\alpha$ -амілаз мікроорганізмами різних таксономічних груп, зокрема бактерій, мікроміцетів. Докладно висвітлюються фізико-хімічні властивості  $\alpha$ -амілаз, їхні рН- та термооптими, рН- та термостабільність, молекулярні маси, вплив іонів металів і різних хімічних реагентів. Розглядається можливість використання  $\alpha$ -амілаз у різних галузях промисловості (спиртовій, крохмале-патоковій, хлібопекарській, кондитерській, текстильній, паперовій тощо), а також у медицині.

**Ключові слова:**  $\alpha$ -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 високоартісних 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.

$\alpha$ -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  $\alpha$ -1,4-зв'язки, утворюючи  $\alpha$ -аномерні сполуки; 2) екзоамілази, що гідролізують  $\alpha$ -1,4- або  $\alpha$ -1,6-зв'язки у термінальних залишках глюкози, утворюючи  $\alpha$ - або  $\beta$ -аномерні продукти; 3) ферменти, які відщеплюють виключно розгалужені  $\alpha$ -1,6-зв'язки, утворюючи лінійний полісахарид; 4) трансферази, що розщеплюють  $\alpha$ -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  $\alpha$ -амілази (ЕС 3.2.1.1; 1,4- $\alpha$ -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  $\alpha$ -глюкозидні зв'язки з утворенням  $\alpha$ -аномерних моно- і олігосахаридів, або трансглікозилуючу активність, внаслідок якої утворюються  $\alpha$ -1,4- або  $\alpha$ -1,6-глікозидні зв'язки або комбінація обох активностей; 2) серед 14 кланів (A–N), які визначено для глікозидаз і трансглікозидаз, родина  $\alpha$ -амілаз (1,4- $\alpha$ -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  $\alpha$ -1,4- і  $\alpha$ -1,6- зв'язків, також  $\alpha$ -1,1-,  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3- і  $\alpha$ -1,5-глікозидні зв'язки; 4) взаємозв'язки головної родини  $\alpha$ -амілаз (клан GH–H) з родиною екстремофільних  $\alpha$ -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 ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> або TIM-barrel (бочонок тріозофосфатізомерного типу) каталітичний домен; 7) 4 консервативні ділянки послідовностей, які присутні у ланцюгах  $\beta$ 3,  $\beta$ 4,  $\beta$ 5 і  $\beta$ 7 каталітичного ( $\beta/\alpha$ )-barrel домена, було ідентифіковано, їх використовують для визначення родини  $\alpha$ -амілаз. В останні роки дослідники [6] встановили наявність трьох додаткових ділянок консервативної послідовності, дві з яких розташовані на ланцюгах  $\beta$ 2 і  $\beta$ 8 каталітичного ( $\beta/\alpha$ )-barrel і одна — поблизу C-кінця домена В у  $\beta$ 3- $\alpha$ 3-зв'язку каталітичного ( $\beta/\alpha$ )-barrel. Тимчасом як 4 ділянки первісно консервативної послідовності містять каталітичні і субстратзв'язувальні залишки індивідуальних членів родини, останні 3 ділянки консервативної послідов-

ності містять амінокислотні залишки, які зумовлюють специфічність даного ферменту. Автори припускають, що ферменти родини  $\alpha$ -амілаз мають бути охарактеризовані як такі, що містять так багато ділянок консервативної послідовності, як тільки можливо.

Відомо, що ферменти родини  $\alpha$ -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  $\alpha$ -амілазних ферментів.

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

$\alpha$ -Амілази ізолюють із різних біологічних джерел: тварин (панкреатична або слинна), злакових (пшениці або ячменю), грибів (види *Aspergillus*) і бактерій (види *Bacillus*). До бактеріальних  $\alpha$ -амілаз належать такі, що працюють як при нормальній температурі (представники *B. subtilis*), так і при дуже високих температурах (*B. licheniformis*).  $\alpha$ -Амілази каталізують розщеплення  $\alpha$ -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.

$\alpha$ -Амілази відіграють суттєву роль у метаболізмі  $\alpha$ -глюкану. Кристалічну структуру раніше не ідентифікованої амілази (AmyC) з *Thermotoga maritima* було визначено за MAD (Multi-wavelength anomalous dispersion). Цей метод застосовують у X-променевої кристалографії [9]. У AmyC відсутня послідовність, яка аналогічна канонічним  $\alpha$ -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
$\alpha$ -Амілаза, що утворює мальтопентаозу	3.2.1	Крохмаль
$\alpha$ -Амілаза	3.2.1.1	Крохмаль
Оліго-1,6-глюкозидаза	3.2.1.10	1,6- $\alpha$ -D-зв'язки у деяких олігосахаридах
$\alpha$ -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
$\alpha$ -Амілаза, яка утворює мальтотетраозу	3.2.1.60	Крохмаль
Глюкодекстраназа	3.2.1.70	Крохмаль
Трегалозо-6-фосфатгідролаза	3.2.1.93	Трегалоза
$\alpha$ -Амілаза, яка утворює мальтогексаозу	3.2.1.98	Крохмаль
$\alpha$ -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). АмуС виявляє риси, характерні для  $\alpha$ -амілаз, такі, зокрема, як скривлена TIM-barrel структура, утворена 7  $\beta$ - і  $\alpha$ -геліксами (домен А) та двома додатковими, але менш консервативними доменами. Один із них — домен В, який містить 3 гелікси, які вставлені в TIM-barrel після  $\beta$ -гелікса 2, а другий — домен С, у якого 5 гелісових зон на С-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 $\alpha$ -амілаз

Оскільки  $\alpha$ -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 нейт-

ральними солями, діаліз, ультрафільтрація, гел-фільтрація, електрофорез, хроматографія тощо.

І. П. Галич [10] розробила спосіб одержання високоочищеного препарату  $\alpha$ -амілази *A. oryzae*, який за основними властивостями відповідає кристалічному. Метод складається з дуже простих операцій (осадження спиртом, стабілізація іонами  $\text{Ca}^{2+}$ , висолування 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  $\alpha$ -амілази мали амілолітичну активність 5 040–5 400 одиниць, містили 70–71% білка, 12–13% вуглеводів, 8–10% пептидів, 6–7% води і 3–4% золи.

Очищення  $\alpha$ -амілази з іншого штаму *A. oryzae* [11] проводили шляхом діалізу фільтрату глибинної культури і подальшою хроматографією на колонці з ДЕАЕ-целюлозою. Кількість  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 —  $\alpha$ -амілази і глюкоамілази. Питома активність  $\alpha$ -амілази після хроматографії на іонообміннику зросла з 0,25 Од · мл<sup>-1</sup> до 1,2 Од · мл<sup>-1</sup> [11].

Виділення  $\alpha$ -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*  $\alpha$ -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 синте-

зуються 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -амілаз *A. flavus*, *A. awamori* та *A. oryzae* [17] показало, що вони характеризувались однаковими значеннями рН-оптимумів активності 5,0–5,25; зона їхньої рН-стабільності — 6,0–8,0; точка найбільшої стійкості — 7,0. Усі три  $\alpha$ -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  $\alpha$ -амілази *A. flavus* — 50 °С, а  $\alpha$ -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  $\alpha$ -амілази, а навпаки, прискорювали їх інактивацію. Цей вплив зростав у послідовності Cl<sup>-</sup> < Br<sup>-</sup> < F<sup>-</sup> < I<sup>-</sup> і притаманний усім трьом ферментам. Сечовина концентрацією від 1,0 до 6,0 М денатурувала білки. Інактивує дія була більш вираженою для  $\alpha$ -амілаз *A. awamori* та *A. oryzae*, стійкішим був фермент із *A. flavus*. ЕДТА — сильний інгібітор усіх трьох  $\alpha$ -амілаз, а атоми кальцію — важливі для їхньої активності й стабільності.

Таблиця 2. Фізико-хімічні властивості деяких  $\alpha$ -амілаз

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

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 вискоєфективних амیلітичних 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 амілітичні комплекси. На живильному середовищі, яке містить пептон і дріжджовий екстракт (pH 7,0), *A. flavipes* синтезував три форми амілази, які відрізнялись оптимальним 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 дізопропілфторфосфату синтезувалась нова форма амілази з оптимальним pH 5,5 та 7,5, максимальною активністю при 60–80 °C і високою стабільністю. Амліаза 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. Амліаза 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. Амліаза 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. Амліаза 3 була металозалежним ферментом, її активність підвищували іони Ca<sup>2+</sup> і Mg<sup>2+</sup>, інгібували — ЕДТА й деякі метали — Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>. На відміну від амілаз морських бактерій, амліаза морського гриба *A. flavipes* виявляла стійкість до екстремально високих концентрацій солі (15% NaCl).

*A. niger* 1119 під час глибинного вирощування продукував амліази з високою активністю (3,9 Од·мл<sup>-1</sup>) 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 рамноліпиду стимулювати активність позаклітинної амілази *Penicillium simplicissimum*.

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 рН 5,0–10,5 з двома рН-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 слабкого, нейтрального і лужного середовищ є істотною перевагою перед іншими  $\alpha$ -амілазами і зумовлює можливість використання його як каталізатора різних промислових реакцій розрідження крохмалевмісної сировини. Іони кальцію, які не впливають на активність  $\alpha$ -амілази, значно підвищують стабільність ферменту, до того ж потреба в іонах цього металу зростає з підвищенням температури інкубації. Крохмаль, як специфічному субстрату  $\alpha$ -амілази, також притаманний високий стабілізуючий ефект. У 22,5% -му розчині крохмалю  $\alpha$ -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  $\alpha$ -амілази дорівнює 83–90 кДа. Молекула  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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, рН 7,0, упродовж 60 год активність амілази, яка продукувалась, становила 65,23 Од/мл. Максимуму активності було досягнуто при рН 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  $\alpha$ -амілази на основі двох продуцентів — *B. subtilis* (аміло-субтилін) 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  $\alpha$ -амілазу (температурний оптимум 90–95 °С, рН-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 · мл<sup>-1</sup>.

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

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

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

Зі зразків південноамериканських ґрунтів виділено штам *B. licheniformis* MIR-61, який продукував підвищену кількість кислоти  $\alpha$ -амілази. У періодичних культурах *B. licheniformis* MIR-61 у фазі експоненційного росту виявляли позаклітинні  $\alpha$ -амілази та глюкозидази. Максимальної активності  $\alpha$ -амілази було досягнуто при  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  і рН 7,0 у пізній експоненційній фазі. Оптимум активності цього ферменту спостерігався при  $50$ – $67 \text{ }^\circ\text{C}$  і рН від 5,5 до 6,0.  $\alpha$ -Амілаза характеризувалася термостабільністю при  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  [26].

$\alpha$ -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  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ , в умовах промислового гідролізу крохмалю. Вона також більш стабільна, ніж  $\alpha$ -амілаза *B. stearothermophilus* і *B. amyloliquefaciens*, попри значну подібність послідовностей між цими трьома білками.  $\alpha$ -Амілаза *B. licheniformis* є цікавою моделлю для білкової інженерії під час дослідження термостабільності й термостабілізації. Автори [27] здійснили мутаційний і структурний аналіз  $\alpha$ -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 поло-

ження, в яких заміщення амінокислот може або підвищити, або знизити значною мірою необоротну термоінактивацію. Коли детальну X-променеву структуру  $\alpha$ -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  $\alpha$ -амілази *B. licheniformis*. Більшість мутацій, які автори вводили в цю ділянку, так чи інакше модифікували стабільність завдяки впливу на електростатичну взаємодію тріади металів  $\text{Ca}$ – $\text{Na}$ – $\text{Ca}$  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  $\alpha$ -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  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , включаючи значне втручання в амілолітичну функцію. Незважаючи на те, що повного розуміння походження природної термостабільності  $\alpha$ -амілази *B. licheniformis* ще не досягнуто, 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  $\alpha$ -амілази *B. licheniformis* є також більш стабільними за низьких значень рН.

Вивчаючи взаємодію  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -амілазу. Фермент достатньо охарактеризований біохімічно, однак його ген поки що не ідентифіковано. Ген *amyP* кодує 80 013-Да зрілий білок з N-кінцевим доменом, який є ідентичним такому родині 13 глікозилгідролаз, таких як  $\alpha$ -амілаза *Bacillus*. Транскрипційний аналіз показав, що *amyP* транскрибується в розчині хемостатної культури. Наведені дані відповідають активності  $\alpha$ -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<sup>t</sup>, що його ізолювано з геотермального ґрунту, локалізованого на горі Рітманн 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)  $\alpha$ -амілазу. Молекулярна маса, визначена за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу, становила 58 кДа. Активність була оптимальною на картопляному крохмалі при рН 5,5 і 80 °С. У присутності іонів Ca<sup>2+</sup> залишкова активність досягала 92% після 1 год інкубації при 70 °С.  $\alpha$ -Амілаза не втрачала активності у присутності фітату (селективний інгібітор  $\alpha$ -амілази) у концентрації 10 мМ і зберігала 90% максимальної активності після 1 год інкубації при 70 °С. ЕГТА і ЕДТА були сильними інгібіторами ферменту.  $\alpha$ -Амілаза гідролізувала розчинний крохмаль при 80 °С з  $K_m$  3,05 мг·мл<sup>-1</sup> і  $V_{max}$  7,35 Од·мл<sup>-1</sup>.

Здатність до продукування позаклітинної  $\alpha$ -амілази було виявлено і в галофільної бактерії *Halomonas meridiana* [33]. Найвища продукція  $\alpha$ -амілази спостерігалась наприкінці логарифмічної фази під час зростання культури на середовищі з 5% солей чи крохмалю за відсутності глюкози. Фермент виявляв максимальну активність при рН 7,0, але був відносно стійким і в лужних умовах. Оптимальні значення температури і солоності для активності  $\alpha$ -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  $\alpha$ -амілази виявлена у *Thermomyces lanuginosus* F<sub>1</sub>. Молекулярна маса й ізоелектрична точка для цього ферменту становили відповідно 55 кДа і 4,0. Максимальну стабільність  $\alpha$ -амілаза виявляла при рН 4,0 і зберігала > 80% активності за рН 5,0–6,0 протягом 24 год. Після інкубації при 90 °С упродовж 1 год  $\alpha$ -амілаза зберігала лише 6% активності. Активність ферменту зростала у присутності Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> і Fe<sup>2+</sup>, але інгібувалася гуанідин-НСІ, сечовиною і ЕДТА. Цей фермент має такі параметри рН і термостабільності, які роблять його перспективним для промислового використання [35].

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

### Практичне застосування $\alpha$ -амілаз

Відомо, що  $\alpha$ -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 містить 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 — рН 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  $\alpha$ -амілази *B. subtilis*. У процесі одержання амілосубтиліну Г3х ферментативне розрідження дозволило висушити культуральну рідину з підвищеним ступенем концентрування в 1,5–2,5 рази і збільшити продуктивність розпилювальної сушарки на 13%, а у виробництві амілосубтиліну 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  $\alpha$ -амілази [41].

Амілази набули широкого біотехнологічного застосування в таких галузях, як текс-

тильна, 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  $\alpha$ -амілази і глюकोамілази.

Для промислового одержання препаратів бактеріальної  $\alpha$ -амілази, окрім *B. subtilis*, використовують також культури *B. amyloliquefaciens* і *B. licheniformis*.  $\alpha$ -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  $\alpha$ -амілази із *B. licheniformis*. Ця амілаза дозволяє проводити гідроліз крохмалю при температурі до 105–110 °С. *B. amyloliquefaciens* у процесі культивування утворює, окрім  $\alpha$ -амілази, нейтральну протеазу,  $\alpha$ -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  $\alpha$ -амілаз використовують штами, які не продукують протеазу. Винятком є  $\alpha$ -амілази *B. licheniformis*. Їхня висока термостабільність дозволяє позбутися небажаних домішок протеази термічною інактивацією без значних втрат  $\alpha$ -амілазної активності.

Бактеріальні  $\alpha$ -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  $\alpha$ -амілази грибного походження. Для їх одержання застосовують культури *A. oryzae* і *A. niger*. Так,  $\alpha$ -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 рН лежить в інтервалі 4,8–5,8, а термостабільність її нижча, ніж у  $\alpha$ -амілази *B. amyloliquefaciens*.

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

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

Препаратам  $\alpha$ -амілази *Aspergillus* притаманна більша оцукрювальна здатність порівняно з препаратами  $\alpha$ -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.  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 розбліхтування рослинного волокна перед відблюванням і фарбуванням. Вихідний продукт — суворя тканина — містить 5% крохмалю і чимало інших домішок, які треба видалити, зробивши тим самим тканину м'якою, здатною змочуватися, краще відблюватися і зафарбовуватися. 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, глянцею, збільшує його міцність.

Амілази використовують і в *промисловості очищення*. За їх участю готують розчинний крохмаль, який застосовують для підкромалювання 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  $\alpha$ -амілаз, наведено результати молекулярних досліджень структури білка та безпосередньо активного центру ферменту, що, у свою чергу, дозволяє досить повно визначити положення  $\alpha$ -амілаз у сучасній класифікації глікозидгідролаз.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Kesavan Madhavan Nampoothiri et al.  $\alpha$ -Amylases from microbial sources an overview on recent developments // 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -(1,4)- and  $\alpha$ -(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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -amylase family // Ibid. — 2002. — V. 11. — P. 21–27.
8. Reddy N. S., Nimmagadda A., Rao S. An overview of the microbial  $\alpha$ -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  $\alpha$ -amylase AmyC from *Thermotoga maritima* // Acta Cryst. — 2006. — V. 62. — P. 262–270.
10. Галич И. П. Хроматографическое исследование высокоочищенных препаратов микробных  $\alpha$ -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.  $\alpha$ -Амилаза *Aspergillus oryzae* // Ферменты. — Тбилиси.: Мецниереба, 1975. — 115 с.

12. Потехина Т. С. Сорбционная иммобилизация микробных амилаз на карбоксильных и углеводных 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 simplicissimum* 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 *Bacillus* sp. PN5 // Bioresource Technology. — 2007. — V. 98, N 2. — P. 260–265.
23. Цурикова Н. В., Нефедова Л. И., Костилова Е. В. и др. Получение активного штамма *Bacillus licheniformis* — продуцента термостабильной  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing // J. of Food Engineering. — 2007. — V. 79, N 3. — P. 950–955.
26. Castro G., Baigori M., Sinerir F. Studies on  $\alpha$ -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. Engineering the thermostability of *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylase // Biologia (Bratislava). — 2002. — V. 11. — P. 203–211.
28. Saboury A. A. Stability, activity and binding properties study of  $\alpha$ -amylase upon interaction with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  // 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. — С. 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 amylopliticus* sp. nov., 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  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -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  $\alpha$ -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana* // FEMS Microbiol. Lett. — 2000. — V. 183, N1. — P. 67–71.
34. Leveque E., Janecek S., Hays B., Belarbi A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes // Enzyme Microb. Technol. — 2000. — V. 26, N1. — P. 3–14.
35. Odibo F., Ulbrich-Hofmann R. Thermostable  $\alpha$ -amylase and glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus* F<sub>1</sub> // 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  $\alpha$ -amylases. A biotechnological perspective // Process Biochem. — 2003. — V. 38. — P. 1599–1616.
38. Ортенберг Э. Ш., Парр Г. С., Столыпин О. С. и др.  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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., Польшгалина Г. В. Методы определения активности гидролитических ферментов. — М.: Легпищпром, 1981. — С. 34–43.
44. Satyanarayana N., Rao J., Ezhilvannan M.  $\alpha$ -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: Kluwer Academic Publishers, 2002. — P. 963–1045.

### МИКРОБНЫЕ $\alpha$ -АМИЛАЗЫ: ВЫДЕЛЕНИЕ, СВОЙСТВА, ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

*Л. Д. Варбанец, Е. В. Авдюк, Н. В. Борзова*

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

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

$\alpha$ -Амилазы представляют одно из наибольших семейств гликозидгидролаз, трансфераз и изомераз, входящих в клан GH-H. Ферменты этого семейства наряду  $\alpha$ -1,4-,  $\alpha$ -1,6-связями способны гидролизовать  $\alpha$ -1,1-,  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3-,  $\alpha$ -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  $\alpha$ -амилаз, которые включают осаждение органическими растворителями и нейтральными солями, диализ, ультрафильтрацию, гель-фильтрацию, хроматографию, электрофорез. Приведены современные данные относительно возможности продуцирования  $\alpha$ -амилаз микроорганизмами разных таксономических групп, в частности бактерий, микромицетов. Детально обсуждаются физико-химические свойства  $\alpha$ -амилаз, их pH- и термооптимумы, pH- и термостабильность, молекулярные массы, влияние ионов металлов и различных химических реагентов. Рассматривается возможность использования  $\alpha$ -амилаз в разных отраслях промышленности (спиртовой, крахмально-паточковой, хлебопекарской, кондитерской, текстильной, бумажной и др.), а также в медицине.

**Ключевые слова:** микробные  $\alpha$ -амилазы, физико-химические свойства, практическое использование.

### MICROBIAL $\alpha$ -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  $\alpha$ -amylase family is the largest family of glycoside hydrolases, transferases and isomerases, comprising in clan GH-H. The enzymes of this family, except of  $\alpha$ -1,4-,  $\alpha$ -1,6-bonds, are able to hydrolyse  $\alpha$ -1,1-,  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3-,  $\alpha$ -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 concerning methods of isolation and purification of  $\alpha$ -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  $\alpha$ -amylases from different taxonomic groups of microorganisms, in particular, bacteria and micromycetes are given. Physico-chemical properties of  $\alpha$ -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  $\alpha$ -amylases usage in different branches of industry — food, detergent, paper, textile, pharmaceutical.

**Key words:** microbial  $\alpha$ -amylases, physico-chemical properties, practical usage.