

В.М. Шкуматов, А.Л. Рудой, С.Л. Овсянко, Н.С. Фролова,

НИИ физико-химических проблем Белгосуниверситета,

В.М. Царенков, П.Т. Петров, А.М. Босенко,

АО "Белмедпрепараты"

**ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ
МИКРООРГАНИЗМОВ — СУБСТАНЦИИ
ДЛЯ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ФЕРМЕНТОТЕРАПИИ**

ВВЕДЕНИЕ

Ферменты гидролитического действия из секрета поджелудочной железы: амилазы, протеазы, липазы — используют как замещающие терапевтические средства для корректировки гипо- и дисферментозов желудочно-кишечного тракта. К лечебным ферментным препаратам относятся импортные — панзинорм-форте, мезим-форте, фестал, мексаза и отечественные — пепсин, панкреатин и др. Перечисленные препараты содержат, однако, преимущественно ферменты животного происхождения, что, в связи с ограничением сырьевых источников, не позволяет организовать крупномасштабное производство очищенных ферментов с использованием установок большой единичной мощности.

Альтернативным подходом для создания комплексных ферментных препаратов медицинского назначения является получение высокоочищенных ферментов из культуральных жидкостей микроорганизмов. В качестве примеров можно привести такие препараты, как террилитин (*Aspergillus terricola*), лизоамидаза (протеолитические ферменты *Pseudomonadaceae*), профензим (щелочные и нейтральные протеазы *Bacillus subtilis*), ораза (*Aspergillus oryzae*), солизим, сомиллаза (*Penicillium solitum*), выпускаемые ранее в СССР, а также импортные препараты — сантелаза, севелаза (Япония), комбизим, комбиаза (Германия), дигалаза (США) и др.

В настоящее время на АО "Белмедпрепараты" организован выпуск технических препаратов ферментов гидролитического действия для применения в спиртовой подотрасли промышленности и сельском хозяйстве. Таким образом, имеется постоянная сырьевая база для получения высокоочищенных препаратов ферментов для создания лекарственных средств.

В то же время применение гидролитических ферментов, особенно в такой области, как медицина, требует тщательного их изучения с точ-

ки зрения структурно-функциональных свойств, сравнения с аналогами животного происхождения. Такого рода исследования возможны при создании в соответствии с требованиями современной биотехнологии научно обоснованных методов выделения и очистки микробных ферментов, стандартизации этих препаратов, разработки количественных методов экспресс-контроля содержания и активности ферментов.

В данной работе описано выделение и очистка до гомогенного состояния ферментов из жидкого концентрата культуральной жидкости *B.subtilis*-94Л, проведен скрининг потенциальных аффинных сорбентов, разработаны методы анализа с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии в сопоставлении с методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях, а также изучены способность к образованию агрегатных форм и устойчивость к протеолитической модификации, имеющие практическое значение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы: диэтиламиноэтилцеллюлоза DE-32 и карбоксиметилцеллюлоза CM-52 ("Whatman", Англия); додецилсульфат натрия, 2-меркаптоэтанол, кумасси голубой R-250, трифторуксусная кислота, натриевая соль холевой кислоты, холевая кислота, твин 80 ("Serva", Германия); сефароза CL-4В, октил-сефароза, сефадекс G-150, сефадекс G-25, амфолиты рН 3,5-8,0, упакованные колонки PD-10 ("Pharmacia", Швеция); TSK-гель Тоуорепарл ("Тоуо Soda", Япония), набор реактивов для электрофореза в полиакриламидном геле: глицин, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид ("Reanal", Венгрия), набор белков-стандартов для гель-электрофореза: альбумин бычий (M_r 66 000), карбоангидраза (M_r 29 000), миоглобин лошади (M_r 17 200), α -лактальбумин (M_r 14 200) ("Sigma", США). Остальные реактивы квалификации не ниже х.ч.

В качестве источника бактериальной α -амилазы и металлопротеиназы использовали жидкий концентрат культуральной среды, полученный в опытно-промышленных условиях на АО "Белмедпрепараты" по следующей технологии. В стерильный ферментатор вместимостью 10м³ загружали питательную крахмалсодержащую стерильную среду и посевной материал. В качестве посевного материала использовали бактериальную культуру *B.subtilis*-94Л — продуцент α -амилазы. Процесс ферментации проводили в условиях, обеспечивающих преимущественное накопление в культуральной жидкости целевого фермента α -амилазы. Полученную культуральную жидкость с α -амилазной активностью 450 ед. в 1 мл после ее осветления путем фильтрации концентрировали на промышленной ультрафильтрационной установке при температуре 6–10°C. Жидкий концентрат, после добавления в

него консервантов и стабилизаторов ферментов, имел плотность 1,06–1,08 г/мл и амилолитическую активность 4200 ед./мл. Наряду с α -амилазой препарат содержал β -глюканазу, протеазы и другие сопутствующие ферменты.

Получение холат-сефарозы [1]: сефарозу CL-4В активировали эпихлоргидрином и аминировали этилендиамином; полученное аминоэтильное производное содержало 10–11 мкмоль первичных аминогрупп в 1 мл осевшего геля. К 33% (по объему) суспензии геля в сухом диоксане добавляли холевую кислоту и N,N'-дициклогексилкарбодимид (конечные концентрации соответственно 0,08 и 0,1 М). Реакционную смесь перемешивали 5 часов при 20°C, затем гель промывали диоксаном, метанолом и водой. Полученный сорбент не давал положительной реакции с тринитробензолсульфоновой кислотой, что свидетельствовало о количественном ацилировании первичных аминогрупп холевой кислотой.

Получение геля поперечно-сшитого крахмала: к 4 г водорастворимого крахмала в 25 мл воды добавляли NaOH до концентрации 0,5 М. При постоянном перемешивании (40°C, 100 об⁻¹) добавляли 2,0 мл эпихлоргидрина и оставляли в тех же условиях в течение 20 часов. Полученный гель продавливали через сито (0-400 меш) и использовали как аффинный носитель для выделения альфа-амилазы.

Выделение и очистка α -амилазы: 50 мл культуральной жидкости обессоливали на колонке (2,5 × 70 см) с сефадексом G-25 и наносили на колонку (2,5 × 20 см) с DEAE-целлюлозой, уравновешенной 0,01 М натрий-фосфатным буфером (pH 7,0) с 1 мМ CaCl₂ (исходный буфер). После промывки колонки 200 мл исходного буфера, 300 мл этого же буфера с добавлением 0,05 М NaCl, фракцию, содержащую α -амилазу, элюировали исходным буфером с 0,4 М NaCl. К полученной фракции (200 мл) добавляли сульфат аммония из расчета 40% от насыщения и наносили на колонку (1,5 × 15 см) с октил-сефарозой. Элюирование осуществляли обратным градиентом сульфата аммония: раствор А трис-HCl буфер (pH 7,0), содержащий 30% сульфата аммония, раствор Б трис-HCl буфер (pH 7,0) со скоростью элюирования 30 мл/ч. Полученную фракцию (90 мл) концентрировали путем высаживания сульфатом аммония. После центрифугирования при 9000×g в течение 20 мин осадок растворяли в минимальном объеме (1–2 мл) исходного буфера. Полученный раствор подвергали хроматографии на колонке (2,5 × 100 см) с сефадексом G-150, уравновешенной исходным буфером с 0,1 М NaCl. Объединенные фракции, содержащие α -амилазу, концентрировали с помощью высаживания сульфатом аммония, растворяли в минимальном количестве исходного буфера и хранили при –20°C.

Выделение и очистка металлопротеиназы: к концентрату культуральной жидкости добавляли охлажденный ацетон до конечной концентрации 80% и через 1 ч инкубации при –20°C образовавшийся осадок отделяли центрифугу-

гированием и растворяли в минимальном объеме 25 мМ ацетатного буфера, рН 6,1, содержащего 1 мМ CaCl_2 . Затем белок отделяли от значительной части пигментов и солей гель-фильтрацией через колонку с сефадексом G-25 (2,5×70 см), уравновешенным тем же буфером. Завершающим этапом очистки металлопротеиназы была хроматография на колонке с карбоксиметилцеллюлозой CM-52, уравновешенной 25 мМ ацетатным буфером, рН 6,1, содержащим 1 мМ CaCl_2 . Фермент десорбировали промыванием колонки 25 мМ ацетатным буфером, рН 6,1, содержащим 1 мМ CaCl_2 и 0,5 М NaCl. Очищенный белок переводили в 0,1 М трис-НСl-буфер, рН 7,2, содержащий 1 мМ CaCl_2 , с помощью колонки PD-10 и хранили при -20°C .

Гель-электрофорез в денатурирующих условиях проводили по методу [2]. Для установления наличия возможных межмолекулярных дисульфидных связей образцы белка перед гель-электрофорезом не обрабатывали 2-меркаптоэтанолом. После проведения электрофореза трубочки геля помещали на 30 мин в 10% трихлоруксусную кислоту, затем отмывали смесью — этиловый спирт, уксусная кислота, вода (5:1:5) и окрашивали 0,1 % раствором кумасси голубого G-250 в 3,5% растворе HClO_4 . Сканирование гелей проводили при длине волны 620 нм в специальной приставке к спектрофотометру "Speckord UV-vis".

Высокоэффективную жидкостную хроматографию осуществляли на жидкостном хроматографе "Милихром-4" в режимах изократического и градиентного элюирования с использованием колонок "Нуклеосил 300 C18", 5 μm . Элюэнт А: 0,1% ТФУ в H_2O , элюэнт Б: 0,1% ТФУ в смеси ацетонитрил: H_2O /80:20. Градиент раствора Б в растворе А создавали в следующем режиме: 0–20% — 2 мин, 20–30% — 5 мин, 30–40% — 5 мин, 40–50% — 5 мин, 50–65% — 5 мин.

Хроматографию низкого давления проводили с использованием автоматической системы "Градифрак" (программирующий коллектор фракций, проточный УФ-монитор, градиентный смеситель, перистальтический насос) ("Pharmacia Biotech", Швеция) в режимах градиентного или изократического элюирования по заданным программам.

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Shimadzu 1210" (Япония) с использованием программы регистрации спектров поглощения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Инактивация α -амилазы в концентрате культуральной жидкости может осуществляться по нескольким механизмам: при экстремально высокой температуре (90°C), моделирующей процесс ускоренной термоинак-

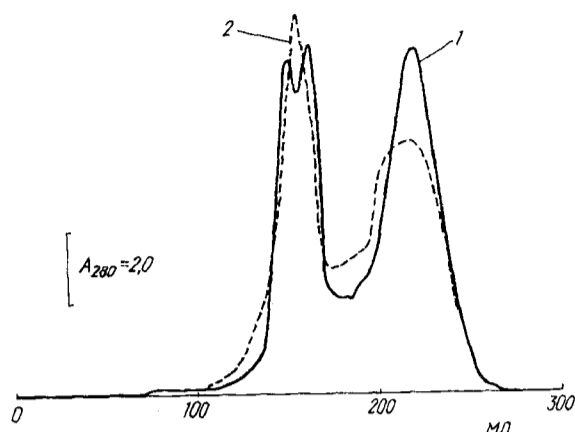


Рис. 1. Хроматография на сефалексе G-150 (100 × 1,6 см) концентрата культуральной жидкости *B. subtilis*. Элюент 0,005 М Трис-НСl + 0,003 М CaCl₂ (рН 7,0). Скорость элюирования 0,2 мл/мин, регистрация — 280 нм, объем наносимой пробы 1 мл: 1 — исходная культуральная жидкость (—); 2 — культуральная жидкость после диализа против 0,2 мМ ЭДТА в 0,005 М Трис-НСl (рН 7) (---)

тивации, имеет место ковалентная модификация, связанная с деамидированием глутаминовой и/или аспарагиновой кислот, играющих важную роль в процессе ферментативного катализа и, возможно, стабилизации нативной конформации фермента; при повышенных значениях рН среды возможно окисление свободных сульфгидрильных групп [3]; необратимый процесс инактивации может быть связан с образованием развернутой, неглобулярной структуры белка, которая подвержена как эндогенной протеолитической атаке, так и процессам агрегации [4, 5].

Эксперименты по гель-хроматографии фильтрата культуральной жидкости показали, что при хранении более 6 месяцев при 4°C белковые компоненты не образуют агрегатных форм, поскольку в нейтральных буферных системах, системах для хроматографии с добавлением неионных (твин 20) и ионных детергентов (натриевая соль холевой кислоты), а также додецилсульфата натрия молекулярная масса белков оставалась без изменений (рис.1). Как правило, при гель-хроматографии культуральной жидкости фиксировалось 3 пика со значениями кажущихся молекулярных масс 58 000 +/- 10 000, 43 000 +/- 7 000 дальтон и 17 000 +/- 4000 дальтон, первые два из которых могли быть отнесены к белковым фракциям и третий — к относительно низкомолекулярным соединениям (пептиды, пигменты). Такое поведение при гель-хроматографии говорит также о том, что α-амилаза в разведенных буферных растворах не образует прочных комплексов с другими макромолекулами (белками, полисахаридами).

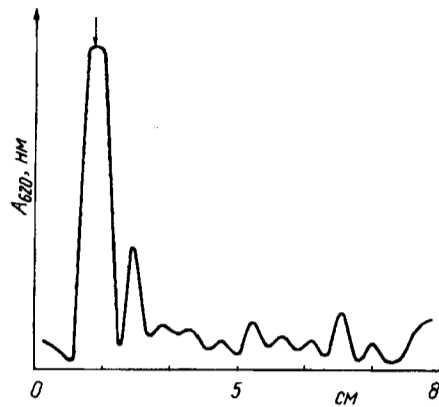


Рис. 2. Электрофореграмма концентрата культуральной жидкости *Bacillus subtilis*, полученная с помощью электрофореза в денатурирующих условиях. Стрелка указывает на положение α -амилазы

Поскольку был определен верхний предел молекулярных масс белковых компонентов в 58 000, а также установлена способность концентрата α -амилазы находиться в растворенном состоянии в органических растворителях (в частности, в ацетонитриле с добавлением ТФУ), то это позволило нам применить метод высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ) с использованием широкопористых носителей на основе силикагеля с привитой фазой С18 с целью количественной экспресс-оценки содержания фермента и степени его чистоты.

По данным гель-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия полипептидный компонент с молекулярной массой в районе 55 000 составлял в концентрате более 30% всех белков (с учетом определения молярной доли обратно пропорциональной молекулярной массе); кроме того, обнаруживалось еще три выраженных белковых полосы с M_r 44000, 30000 и 16000, соответственно (рис. 2). ВЭЖХ-анализ показал наличие около 10 пиков белковых веществ, три из которых в концентрате α -амилазы являлись доминирующими (рис. 3). Расхождение в количественном определении белков после сканирования гелей (при длине волны 620 нм) и по поглощению при 280 нм при высокоэффективной обратнофазовой хроматографии может быть связано с различными коэффициентами молярной экстинкции при 280 нм для различных белковых компонентов.

Экстрацеллюлярные протеиназы, присутствующие в препаратах α -амилазы, могут существенно изменять активность фермента при продолжительном хранении и при манипуляциях в неконтролируемых температурных режимах. Штамм *B. subtilis* продуцирует щелочную протеазу (arg176), ингибируемую фенилметилсульфонилфторидом, и нейтральную протеазу (prg 1), ингибируемую ЭДТА.

В связи с этим исследована инактивация α -амилазы в концентрате культуральной жидкости под действием сопутствующих протеаз.

1. Препарат подвергался гель-хроматографии через сефадекс G-25 с целью удаления избытка стабилизатора — ионов Ca^{2+} , а для ускорения процесса “разворачивание — неправильное свертывание” нативной гло-

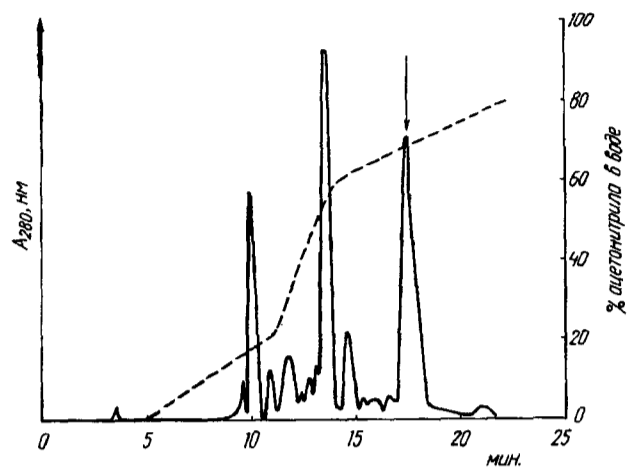


Рис. 3. Разделение белковых компонентов концентрата культуральной жидкости *Bacillus subtilis*. Колонка: 80x2 мм, нуклеосил 300 C₁₈, 5 мкм. Элюэнт А: H₂O + 0,1% ТФУ. Элюэнт Б: 80% ацетонитрил в H₂O + 0,1% ТФУ. Стрелка указывает на положение α-амилазы. Скорость потока 100 мкл/мин, регистрация — 280 нм, проба — 10 мкл

- булы нагревался при температуре 65°C в течение 10 мин. Затем при температуре 25°C отбирались с интервалами пробы для гель-электрофореза с общей продолжительностью 48 ч. Электрофоретический профиль белковых компонентов оставался без изменения в течение 48 ч. Это говорит о том, что прочно связанные ионы Ca²⁺ обеспечивают поддержание нативной структуры α-амилазы и ее устойчивость к эндогенному протеолизу под действием щелочной протеиназы.
2. Препарат диализовали против ЭДТА с целью полного удаления ионов Ca²⁺, в том числе и хелатированного с остатками глутаминовой и аспарагиновой кислот. По данным определения активности, происходила инактивация α-амилазы (остаточная активность составляла менее 1%), но данные гель-электрофореза не показали изменений содержания полипептидов с M_r 55 000, что могло бы являться следствием неупорядоченного протеолиза α-амилазы. Очевидно, при этом одновременно инактивируется и эндогенная металлотрансфераза, поэтому гель-электрофорез не показал образования низкомолекулярных, кислоторастворимых пептидов. К тому же удаление ионов Ca²⁺ путем диализа против ЭДТА с последующей гель-хроматографией в отсутствие ионов Ca²⁺ приводило к некоторому изменению элюционного профиля α-амилазы: фиксировалось только два пика с M_r 50000 и 16000 Дальтон.
 3. Препарат обессоливали на колонке PD-10, прогревали 10 мин. при 70°C и затем добавляли 1/4 часть необработанного концентрата куль-

туральной жидкости. Данные гель-электрофореза свидетельствовали о медленной деградации части белка за счет эндогенного протеолиза.

Таким образом, концентрат культуральной жидкости, содержащий в качестве целевого фермента преимущественно α -амилазу, характеризуется стабильностью этого фермента в отношении температурной и протеолитической инактивации. Основные факторы стабилизации активности фермента: наличие ионов Ca^{2+} , остаточных декстринов, высокая концентрация белков и высокая ионная сила фильтрата культуральной жидкости — являются обоснованными. Поэтому критерии активности препарата, заложенные в “Технических условиях”, правомочны и позволяют использовать его в течение 4 суток без существенного изменения активности. Очистка α -амилазы достигнута с использованием стандартных процедур: фракционирования сульфатом аммония, ионообменной, гидрофобной и гелевой хроматографии.

Как для очищенного фермента, так и для концентрата культуральной жидкости при гель-электрофорезе были получены аналогичные результаты: в обоих случаях молекулярная масса оставалась без изменений как в присутствии 2-меркаптоэтанола, так и в его отсутствии. Это говорит о том, что при относительно продолжительном хранении жидкого концентрата (свыше 6 месяцев) не происходит образования гомо- и гетеро-межмолекулярных дисульфидных связей.

Хорошая сходимость значений молекулярных масс в нативных и денатурирующих условиях свидетельствует о том, что белок организован как мономерный полипептид.

Возможно, белок N-гликозилирован, поскольку молекулярная масса при гель-хроматографии несколько выше, чем при гель-электрофорезе в денатурирующих условиях, при котором белковая полоса “размыта” и асимметрична; на это же указывают и достаточно диффузные зоны элюирования при хроматографии на DEAE-целлюлозе.

Изоэлектрическое фокусирование в присутствии амфолитов с диапазоном pH 3,5–8 позволило установить изоэлектрическую точку в районе pI 4,5–4,8, т.е. отнести белок к кислым. При этом, по нашим данным, значительная часть белка необратимо агрегировала в процессе изоэлектрофокусирования, что, очевидно, требует введения неионных дезагрегантов типа мочевины.

При использовании традиционных методов выделения белков мы столкнулись с проблемой отделения остаточных декстринов, которые обладают средневесовой степенью полимеризации 70–500, т.е. практически перекрывают диапазон молекулярных масс фракционируемых белков. В концентрированных белковых растворах с высокой ионной силой декстрины способны образовывать комплексы с целевым белком, стабилизированные гидрофобными взаимодействиями, и с пигментами, придающими концентрату интенсивно коричневый цвет. В результате нарушаются

стандартные процедуры выделения и очистки белков: фракционирования сульфатом аммония, ионообменной и гидрофобной хроматографии. В то же время в разведенных растворах и при низкой ионной силе α -амилаза и декстрины не образуют комплексов и элюируются в соответствии со значениями перекрывающихся кажущихся молекулярных масс.

Хотя сообщено о многих методах выделения α -амилазы, эффективные воспроизводимые технологии выделения и очистки в препаративном масштабе до сих пор требуют разработки. Прежде всего это касается разработки быстрых и экономически выгодных методов аффинного выделения α -амилазы (выделения по биоспецифическому средству), которые должны быть основаны на понимании основных принципов структурной организации и механизма действия этого фермента. Ферменты амилолитического комплекса: α -амилаза (α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.1), глюкоамилаза (амилоглюкозидаза, α -1,4-глюкан-глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3) и β -амилаза (КФ 3.2.1.2) — действуют в различной последовательности на одни и те же субстраты (крахмал, амилозу, амилопектин, гликоген) по связям глюкан α -1,4 полисахаридной цепи. Поскольку ферменты имеют одни и те же последовательные промежуточные субстраты-продукты и их активности перекрываются между собой, определенные методические трудности связаны с разделением этих ассоциированных ферментов.

α -амилазы *B. subtilis* являются консервативной группой белков: первичная структура ферментов из различных штаммов характеризуется наличием сигнальной последовательности (аминокислоты 1-31, сигнальный домен); последовательности препропептида (аминокислоты 32-41, домен), эти домены отщепляются от фермента в процессе посттрансляционной протеолитической модификации; участком в аминокислотной последовательности (42-477), которая является “зрелой амилазой”, или “продуктом”, в котором имеется консервативная гомологичная область (аминокислоты 185-313), содержащая активный участок фермента (остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот) и участок хелатирования стабилизатора — ионов Ca^{2+} (остатки аспарагиновой кислоты и гистидина). Наблюдаемые отличия в первичной структуре амилаз из различных источников затрагивают СООН-концевую последовательность белка без значительного изменения удельной активности фермента [7-9].

Исходя из структурных особенностей α -амилаз, можно рассчитывать, что в области изоэлектрической точки макромолекула белка находится в состоянии с максимальным собственным дипольным моментом. При этом значении рН α -амилаза содержит максимальное количество положительных и отрицательно заряженных групп на макромолекуле, хотя в результате взаимной компенсации суммарный заряд глобулы белка равен нулю. При повышении рН раствора от изоэлектрической точки происходит деионизация аминокислотных групп, в первую очередь гистидина, и одновремен-

ное нарастание количества отрицательно заряженных карбоксильных остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот. Для того чтобы усилить гидрофобные взаимодействия белка с алкил- и холатзамещенными сефарозами, мы использовали дегидратацию белковых глобул добавлением сульфата аммония в концентрации 1,4 М и 1,8 М соответственно. Элюирование осуществлялось использованием обратного градиента сульфата аммония; максимум пика соответствовал концентрации 0,9 М в случае октил-сефарозы. Более высокое разрешение было достигнуто с использованием холат-сефарозы. Белок сорбировали из раствора сульфата аммония в концентрации 1,8 М и элюировали обратным градиентом; максимум пика белка приходился на 0,7 М. В обоих случаях обнаруживали необратимое связывание с носителями окрашенного материала, не элюируемого в буферах, содержащих додецилсульфат натрия и NaOH, этиловый спирт.

Поперечно-сшитый крахмал или амилоза используются для селективного выделения α - и β -амилаз [10–12] и в то же время служат для методов экспресс-контроля активности этих ферментов, основанных на переводе поперечно-сшитого полимера в растворимое состояние под действием амилаз [13, 14]. Нами разработаны условия селективного связывания α -амилазы с аналогом субстрата, в роли которого выступает поперечно-сшитая амилоза. Эффективность выделения зависит от степени поперечной сшивки водорастворимого крахмала, специальных приемов предобработки неочищенного ферментного препарата и проведения хроматографии при высокой ионной силе и относительно низких значениях pH и температуры среды.

Литература

1. Juvonen R.-O., Shkumatov V.M., Lang M.A. // *Eur. J. Biochem.* 1988. Vol. 171. P. 205.
2. Weber K., Osborn N. // *J. Biol. Chem.* 1969. Vol. 244. P. 4406.
3. Tomazic S.J., Klibanov A.M. // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263, N 7. P. 3086.
4. Ulbrich R., Kvesitadze G., Schellenberger A. // *Acta Biol. Med. Ger.* 1982. Vol. 41, N 6. P. 509.
5. Lecker D.N., Khan A. // *Biotechnol. Prog.* 1996. Vol. 12, N 5. P. 713.
6. Haddaoni E.A., Leloup L., Petit-Glatron M.F., Chamber R. // *Eur. J. Biochem.* 1997. Vol. 249, N 2. P. 505.
7. Mantsala P., Zalkin H. // *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254, N 17. P. 8540.
8. Yamane K., Hirata Y., Farusato T., Yamazaki H., Nakayama A. // *J. Biochem.* 1984. Vol. 96, N 6. P. 1849.
9. Emori M., Moruo B. // *Nucleic Acid Res.* 1988. Vol. 16, N 14B. P. 7178.
10. Weber M., Foglietti M.J., Percheron F. // *Biochimie.* 1976. Vol. 58, N 11-12. P. 1299.
11. Sredansky M., Kremnický L., Sturdik E., Feckova A. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1993. Vol. 38, N 3. P. 269.
12. Kobayashi M., Sasaki Y., Kobayashi S. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997. Vol. 61, N 5. P. 813.
13. Valsanesku T., Mateescu M.A., Schell H.D., Enache E. et al. // *Anal. Biochem.* 1985. Vol. 146, N 2. P. 299.
14. Safarik I. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1991. Vol. 22, N 1. P. 61.