

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА α -АМИЛАЗЫ *BACILLUS* SP. 406 И АНАЛИЗ ЕЁ НУКЛЕОТИДНОЙ И АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

А.В. Качан, О.Б. Русь, А.Н. Евтушенко

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

α -Амилазы (ЕС 3.2.1.1) имеют важное промышленное значение среди гидролизующих крахмал ферментов, осуществляя гидролиз внутренних α -1,4-гликозидных связей. Они разрезают полимеры крахмала до мальтозы либо мальтоолигосахаридов различной длины. Благодаря этому α -амилазы широко используются в промышленных процессах переработки крахмала: в производстве глюкозных сиропов и этилового спирта, в хлебопечении, в производстве бумаги. В большинстве этих процессов желательным является использование высокотермостабильных ферментов [1].

Ферменты с амилазной активностью найдены у многих эукариот и эубактерий. В промышленности активно используются бактериальные α -амилазы, продуцируемые бактериями рода *Bacillus*, и грибные α -амилазы, синтезируемые грибами рода *Aspergillus*. Температурные оптимумы активности амилаз из разных организмов варьируются от 25 °С до 90 °С. Оптимум активности бактериальных α -амилаз обнаруживается в диапазоне рН - от 1,0 до 11,5, а субстратная специфичность изменяется по предпочтению цепей разной длины и по способности гидролизовать α -1,6-связи в разветвленных полимерах глюкозы [2].

На основе исследования первичных структур большого числа α -амилаз и родственных им ферментов из разных организмов были обнаружены общие для амилолитических ферментов особенности. α -Амилазы имеет три домена. Каталитический домен А формирует β / α β -цилиндрическую структуру (ТМ-цилиндр) и имеет две крупные петли, образующие домены В и С, которые богаты β -слоями и участвуют в распознавании и укладке субстрата. Все известные α -амилазы содержат в структуре один или несколько ионов кальция, принимающих участие в поддержании активности и стабильности фермента [3].

В ходе ранее проведённых исследований [4] из образцов почвы нами выделен штамм бактерий *Bacillus* sp. 406, клетки которого способны синтезировать термостабильную амилазу. Данный фермент характеризуется высокой термостабильностью – при инкубации в течение 1 часа при 80 °С активность неочищенного ферментного препарата снижается лишь на 11% от первоначальной.

Целью данной работы являлось клонирование кодирующего гена термостабильной амилазы *Bacillus* sp. 406 в клетках *Escherichia coli*, определение его нуклеотидной последовательности, а также проведение компьютерного анализа структуры фермента.

Методы исследования

Бактерии штамма *E. coli* XL1-Blue ($F^-::Tn10(Tet^r)$, $proA^+B^+$, $lacI^q$, $\Delta(lacZ)M15 / recA1$, $endA1$, $gyrA96(Nal^r)$, $thi-1$, $hsdR17(r_k^- m_k^-)$, $glnV44$, $relA1$, lac), взятого из коллекции штаммов микроорганизмов кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ, использовали для клонирования рекомбинантных молекул.

Выделение плазмидной и тотальной ДНК, агарозный гель-электрофорез, рестрикционный анализ, кальциевую трансформацию и электропорацию проводили по стандартным методикам, описанным в руководстве Маниатиса [5].

Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit согласно рекомендуемому изготовителем протоколу.

Секвенирование ДНК проводилось по методу Сэнгера с использованием набора реактивов Cycle Reader™ Auto DNA Sequencing Kit (Fermantas). Для амплификации использовались меченые Cy5-праймеры: прямой праймер для сайта NdeI плазмиды pUC18, и обратный секвенирующий праймер M13/pUC. Разделение и детекция амплифицированных фрагментов проводились с помощью системы ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech) по стандартной методике с соответствующим программным обеспечением.

Анализ нуклеотидной последовательности проводили с помощью программ BLAST [6], BPROM (Softberry Inc.) (<http://softberry.ru>), Prokaryotic Promoter Prediction (Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, Haren, the Netherlands) (<http://bioinformatics.biol.rug.nl>). Анализ аминокислотной последовательности проводили с помощью программ BLAST [6], SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) [7], ProtParam (<http://www.expasy.org>) [8], ClustalX 1.83 [9] и Phyre Server [10].

Результаты и обсуждение

Клонирование гена термостабильной амилазы штамма *Bacillus* sp. 406 с использованием вектора pUC18 проводили согласно схеме, представленной на рисунке 1. Из клеток штамма *Bacillus* sp. 406 выделяли хромосомальную ДНК, которую после неполного гидролиза рестриктазой HindIII лигировали с предварительно обработанной той же рестриктазой ДНК вектора pUC18. Полученные конструкции вводили в клетки *E. coli* XL1-Blue методом электропорации. Отбор клонов с искомой плазмидой проводили на среде с X-gal, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, а затем на среде, содержащей 1% крахмала.

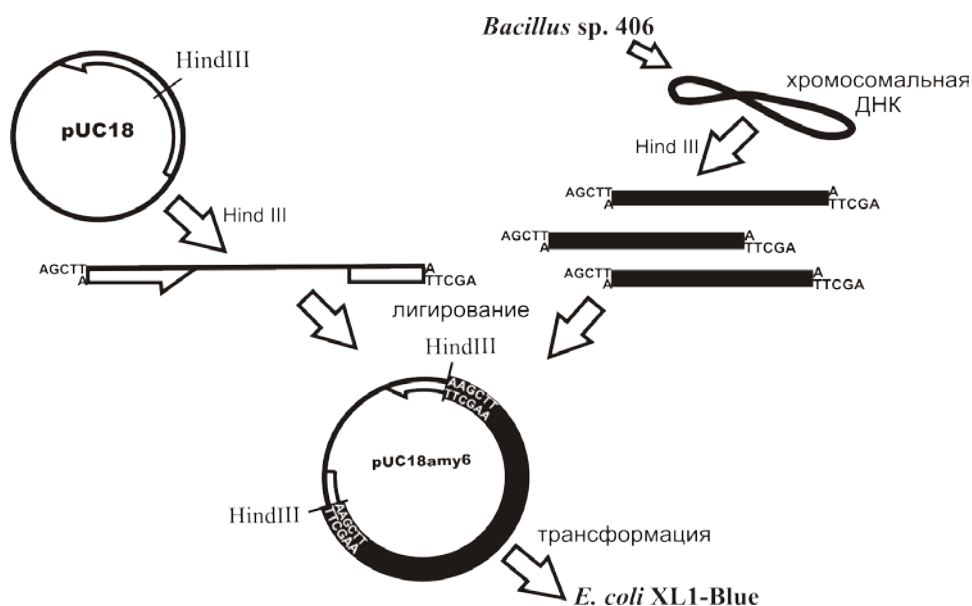


Рисунок 1 - Схема клонирования гена амилазы *Bacillus* sp. 406 в клетках *E. coli*.

В результате был отобран клон, образующий зоны гидролиза на чашках с 1 % крахмала. Рестрикционный анализ выделенной из его клеток плазмидной ДНК, названной pUC18amy6, с помощью ферментов *EcoRI*, *BamHI*, *NdeI* и *HindIII*, показал, что клонированный фрагмент имеет длину около 4,1 т. п. н. С учётом того, что средний размер генов амилаз из клеток *Bacillus* колеблется около значения 1,5 т. п. н. [11], это даёт основание полагать, что в данной плазмиде присутствует инсерция полноразмерного гена амилазы штамма *Bacillus* sp. 406. Рестрикционная карта плазмиды pUC18amy6 представлена на рисунке 2. Также было обнаружено, что удаление участка размером 1,3 т.

п. н. между сайтами рестрикции *Hind*III не инактивирует синтез функционального фермента.

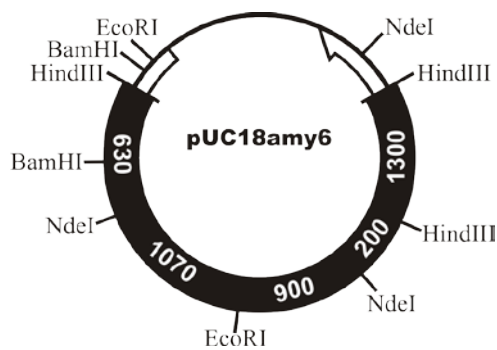


Рисунок 2 – Результаты картирования плазмиды pUC18amy6 по сайтам рестрикции *Eco*RI, *Bam*HI, *Nde*I и *Hind*III. Цифрами показано расстояние (в п. н.) между двумя соседними сайтами рестрикции. Жирной чёрной линией изображён клонированный фрагмент хромосомы *Bacillus* sp. 406, белой стрелкой – участок гена *lacZ*.

Для секвенирования фрагмент хромосомы *Bacillus* sp. 406 в плазмиде pUC18amy6 решено было разделить на 3 участка между сайтами рестрикции *Eco*RI и *Nde*I. Их выделяли и встраивали с плазмиду pUC18 по соответствующим сайтам. Три полученные рекомбинантные конструкции с инсерциями длиной 630, 900 и 1070 п. н., после обработки РНКазой А и очистки с помощью экстрагирования фенолом, использовались в качестве матриц для постановки секвенирующей реакции.

Нуклеотидные последовательности исследуемого гена и фланкирующих его участков хромосомы штамма *Bacillus* sp. 406 представлены на рисунке 3.

Во вставке плазмиды pUC18amy6 определена последовательность 2355 нуклеотидов. Она включает в себя 29 открытых рамок считывания. При анализе последовательности с помощью программы BLAST [6], обнаружено, что часть из них кодирует продукт, гомологичный С-концевому участку белка общего стресса 26 грамположительных бактерий. За этим участком располагается 2 инвертированных повтора, вероятно играющих роль

ρ-независимых терминаторов транскрипции. Наиболее длинная рамка считывания длиной 1548 нуклеотидов занимает большую часть вставки pUC18amy6 и начинается со стартового кодона GTG. Левее на 7 нуклеотидов от него располагается последовательность Шайна-Дальгарно (SD) (см. рис 3), комплементарная 3'-концу 16S рРНК *Bacillus subtilis* [12].

С помощью программ BPR0M (<http://softberry.ru>) и Prokaryotic Promoter Prediction (<http://bioinformatics.biol.rug.nl>) слева от старт-кодона GTG были обнаружены 2 предполагаемых промоторных области, напоминающие консенсусную последовательность промотора σ^A -типа *Bacillus subtilis* [13]. На рисунке 3 эти области представлены как P1 и P2.

Правее от стоп-кодона трансляции TAA обнаружена последовательность, содержащая инвертированный повтор (+1562 - +1595). Предположительно, на данном участке мРНК может образовываться шпильчатая структура со стеблем длиной 13 п. н., выполняющая роль ρ-независимого терминатора транскрипции.

Кроме того, были обнаружены два участка, имеющие сходство с консенсусной последовательностью *cre*-сайта WTGNAANCGNWWNCA, с которой происходит связывание комплекса белков катаболитного контроля у *Bacillus subtilis* и родственных организмов, чем достигается катаболитная репрессия оперонов утилизации источников питания, в том числе и генов амилаз [14]. На рисунке 3 эти области представлены как *cre1* и *cre2*. Сходство *cre2* с консенсусной последовательностью значительно ниже, чем у *cre1*.

Аминокислотная последовательность амилазы штамма *Bacillus* sp. 406, определённая по полученной нуклеотидной последовательности рамки считывания (которая соответствует полипептиду длиной 515 аминокислотных остатков), была сопоставлена с известными последовательностями белков с помощью программы BLAST [6]. Оказалось, что она

```

-624 NdeI catatgtcagatgtaaaacaaaaagtactatctatcttttagataactataaggttggcagccttgccacaatccaaaataacaaa -
541
-540 accctattctcgctttatgatgttttctcacgacgacctgtactttacacagcaacaacaaaaacgcgcaaggttgacgacattca -
451
-450 atctaaccatacgttcatattctcctcggctatgacggccaaggctggaatgatccgatggtgaaatcgaagcaaaagctctaattga -
361
-360 agacaacaagaactaaaagaacgttttggaacgaccatttaaagaatggattaacagcccagacgacccaaactacgtgctccttca -
271
-270 gctaacacctgaaaatattcgctacttcgaaaaagcaggtagcgaaccttggagagttataaTCCTTTAAAAAGCTCAAACAAGAAATT -
181
-180 TCTTGTTTGAGCGTTTTTATGCTTTTAGCTTTATATAGTCAATAAAGCTGATGAATTTTTATTTTTTAAAAAACTAGATAACTTCTTT -91
-90 CTTTTTTTGTGAAAAAAGAAGGATTTTTTATGTTCATCTCTAAACCCTCTTTGGTAACTTTACAAAAAGTCAAGGGGATGGAAAT -1
cre1
SD
cre2
+1 GTGAGAACAAAAAGTTCAAGAACATGGTTTACTTTACTTCTTGTCTTTATTGATTTTTTGTCCCAACCGTTTCCACCGAATCATAAAGCGGAA 90
V R T K S S R T W F S L L L A L L I F V P T V A P N H K A E
91 GCAGCAGCGCAAAACGGAACGATGATGCAACTTTGAATGGTACGTGCCCAACTGGAACCGATTGCGCAATGATGCG 180
A A A Q N G T M M Q Y F E W Y V P N D G Q H W N R L R N D A
181 GCATACTTAAAAAGCATAGGTGTTTTCGGCTGTTTGGACACCTCCTGCTTATAAAGGTACAAGCCAAAATGATGTTGGATATGGCGCTTAT 270
A Y L K S I G V S A V W T P P A Y K G T S Q N D V G Y G A Y
271 GATCTCTATGATTTAGGAGAATTCATCAAAAGGACGATTCGAACAAAGTACGGAACAAAAGCAGAATTAATAATCAGCGGTTAGTACTCTC 360
D L Y D L G E F I K R T I R T K Y G T K A E L K S A V S T L
361 AAATCAAACGGCATTCAAGTATATGGAGATGTCGTTATGAATCATAAAGGTGGCGCTGACTATACTGAAAACGTAACAGCAGTTGAAGTA 450
K S N G I Q V Y G D V V M N H K G G A D Y T E N V T A V E V
451 AACCTTTCTAACCGAAATCAAGAAACTTCAGATGAATATACCATCCAAGCGTGGACTGGCTTTAACTTTCCAGGTGCGGGGACTACGCAC 540
N P S N R N Q E T S D E Y T I Q A W T G F N F P G R G T T H
541 AGTCCATTTAAATGGCAGTGGTATCATTTTGTGGAACGGACTGGGATCAATCACGAAACGCCAGCCGATTTTTAAATCCGTGGAAACA 630
S P F K W Q W Y H F D G T D W D Q S R N A S R I F K F R G T
631 GGAAGCGTGGGACTGGGAAGTATCAAGTGAACCGCAACTATGATTTAATGTATGCTGACCTTGATTTTGTATCACCCGATGTT 720
G K A W D W E V S S E N G N Y D Y L M Y A D L D F D H P D V
721 GGAACGAAATGAAGAACTGGCCGTATGGTACGCAACGAAGTCGGCTTAGACGGCTTTTCGCTTAGACGCAGTGAACATATTAAGCAT 810
G N E M K N W A V W Y A N E V G L D G F R L D A V K H I K H
811 CCCTACTTAGGGGATTGGGTCAACCATGTTCTGACGAAAACCGAAAAGAAATGTTTACAGTGGCAGAGTACTGGCAAAACGATGTAAT 900
P Y L G D W V N H V R T K T G K E M F T V A E Y W Q N D V N
901 GCCATTAATAACTACCTAGCAAAGGTAACCTATAACCATTTCTGCTTTGATGCACCTTCTACTACAATTTCCATTATGCTTCTCAGTCT 990
A I N N Y L A K V N Y N H S V F D A P L H Y N F H Y A S Q S
991 GGTGAAATACGATATGAGAAATTTATTAACGGAACGGTGTGTGCTGCACCCCAACAAAGCCGTAACGTTAGTTGAAAATCACGAT
1080
G G N Y D M R N L L N G T V V A A H P T K A V T L V E N H D
1081 TCACAGCCAGGTCAGTCCCTAGAATCCGTTGTACAGCCTTGGTTTAAACCGCTAGCCTATGCGTTTTATCCTAACACGAGCAGAAGGTTAC
1170
S Q P G Q S L E S V V Q P W F K P L A Y A F I L T R A E G Y
NdeI
1171 CCAAGCATATTTTACGGTGACATGTACGGTACAAAAGGAAACAGTTTCATATGATATACCAGCTTTAAAAACAAAGATAGAGCCTCTATTA
1260
P S I F Y G D M Y G T K G N S S Y D I P A L K T K I E P L L
1261 AAAGCTCGTAAAGATTACGCATACGGTACGCAGCACAATTATATGGACCACTGGGACGTAATTGGCTGGACGCGAGAAGGAGACAGCACA
1350
K A R K D Y A Y G T Q H N Y M D H W D V I G W T R E G D S T

```

1351 AAAGAAAATCTGGTCTCGCAACGCTTGTACAGATGGAGCTGGCGGATCAAATGGATGTATGTTGGAAAAACAAAACGCTGGTGAGGTT
 1440 K E K S G L A T L V T D G A G G S K W M Y V G K Q N A G E V

BamHI
 1441 TGGTACGACATTACAGGTAATCGAACAGATAAGATTACGATTAATACAGATGGATGGGGGAATTTCCAAGTAAACGGTGGATCCGATCTC
 1530 W Y D I T G N R T D K I T I N T D G W G N F Q V N G G S V S

1531 GTTACGGTCAGCAATAAAAAACAACAAAAATAAGCTCTGCGGTGAAGCATTATCCCGCAGAGCTTTTAAATAGTAACTCTCAACCTCG
 1620 V Y G Q Q stop ————— → ← —————

1621 GAAATCGATACATCGTATTACAGAGTAAACTATGTTTATCTAATACAAATTAGACGGAAATCTGCATGGTGGATAGCATTGGGAA
 1710

Рисунок 3 - Нуклеотидная и аминокислотная последовательности гена амилазы и фланкирующих его последовательностей. Нуклеотидная последовательность длиной 2355 нуклеотидов пронумерована, начиная с первого основания стартового кодона GTG. Аминокислотная последовательность представлена под нуклеотидной. Сайты рестрикции для *EcoRI*, *BamHI*, *NdeI* помечены линией над последовательностью. -10- и -35-сайты предполагаемых промоторов (P1 и P2) выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Палиндромные последовательности во фланкирующих областях гена амилазы помечены стрелками под нуклеотидной последовательностью. Предполагаемая последовательность Шайна-Дальгарно (SD) выделена рамочкой. Предполагаемые области *cre* (*cre1* и *cre2*) выделены тёмным прямоугольником. Рамка считывания белка общего стресса 26 написана мелкими прописными буквами.

показывает наиболее высокую гомологию с α -амилазами из *Cytophaga* sp. (78% идентичных аминокислот), *Bacillus cereus* (75% идентичных аминокислот), *B. megaterium*, *B. anthracis* и *B. thuringiensis* (74-76% идентичных аминокислот). Гомология с термостабильными α -амилазами ниже – *B. licheniformis* (72% идентичных аминокислот), *B. amyloliquefaciens* (71% идентичных аминокислот), *B. stearothermophilus* (64% идентичных аминокислот).

В аминокислотной последовательности с помощью программы SignalP [7] был обнаружен сигнальный пептид длиной 31 аминокислотный остаток (рис. 4). Его структура и расположение типично для сигнальных пептидов белков бактерий рода *Bacillus* [15].

В программе ProtParam [8] на основании аминокислотной последовательности были рассчитаны молекулярная масса и теоретическая рI амилазы *Bacillus* sp. 406. Для внутриклеточного предшественника фермента (с сигнальным пептидом) эти значения составляют 58,3 кДа и 6,26 соответственно. Для секретированного фермента (без сигнального пептида) эти значения равны 54,9 кДа и 5,93 соответственно.

Сравнение аминокислотных последовательностей α -амилаз *Cytophaga* sp., *Bacillus cereus*, *B. licheniformis* и *B. subtilis* с исследуемой с помощью программы ClustalX 1.83 [9] показало наличие в исследуемой последовательности 4 высоко консервативных областей, характерные для ферментов семейства α -амилаз [2]. На рисунке 4 они показаны как области 1-4. Считается, что они формируют активный центр, сайт связывания субстрата и кальций-связывающий сайт. Три остатка в α -амилазе *B. licheniformis* (BLA), связывающие ион кальция [3], консервативны и в исследуемой последовательности (см. рис. 4).

Моделирование вторичной структуры с помощью программы Phyre Server [10] показало в исследуемом белке сходное с BLA [3] расположение α -спиралей и β -слоёв (см. рис. 4), что позволяет говорить о том, что третичная структура фермента имеет типичные для α -амилаз домены. Домен А содержит восемь β -слоёв и восемь α -спиралей ТИМ-цилиндра [3] и три каталитических остатка Asp232, Glu262 и Asp329 (см. рис. 4). Домен В лежит между третьим β -слоем и третьей α -спиралью ТИМ-цилиндра. На рисунке 4 видны некоторые различия в структуре домена В у BLA и исследуемого фермента. Домен С представляет собой домен из нескольких β -слоёв [2]. Предположительная вторичная структура С-домена исследуемого белка типична для α -амилаз бактерий рода *Bacillus*.

Различными группами исследователей были получены варианты BLA с повышенной термостабильностью. Так, мутации His133Tyr и Ala209Val в BLA приводили к значительному

увеличению стабильности [16]. Позже эта же группа учёных сообщила об ещё трёх стабилизирующих заменах в BLA: Asn190Phe, Gln264Ser и Asn265Tyr [16]. Затем удалось

обнаружить мутации Met15Thr и Asn188Ser, которые также стабилизировали BLA [17].

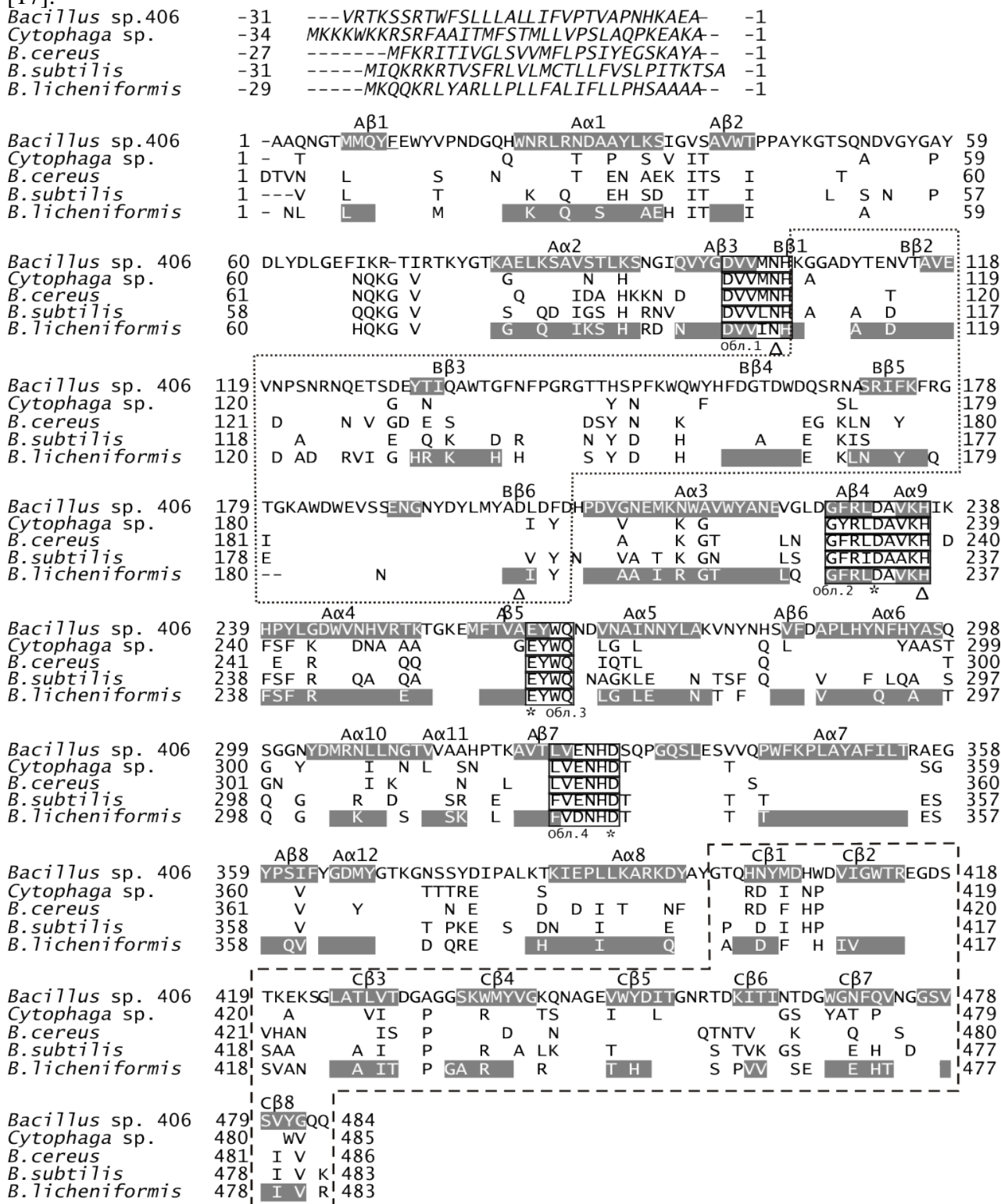


Рисунок 4 - Сопоставление аминокислотных последовательностей и элементов вторичной структуры α -амилаз. Нумерация аминокислотных остатков начинается с первого остатка внеклеточного фермента (без сигнального пептида). Сигнальный пептид обозначен

курсивом. Рамкой выделены консервативные области α -амилаз (Обл. 1-4). Пунктирными контурами обведены домены В и С. Звездочкой (*) и треугольником (Δ) под последовательностями отмечены остатки, формирующие активный и Ca^{2+} -связывающий сайты соответственно (данные для BLA). Над последовательностями обозначены элементы вторичной структуры BLA (первая буква – название домена, вторая – укладка полипептидной цепи (α - или β -структура)), которые на последовательностях выделены тёмным фоном. В рисунке используются данные о вторичной структуре для BLA [3] и для α -амилазы *Bacillus* sp. 406 (смоделировано с помощью Phyre Server [10]).

Отметим, что исследованная нами последовательность имеет остаток Tyr132, находящийся в положении, аналогичном His133 у BLA дикого типа, также как и Ser189 в положении, аналогичном Asn188 BLA. Аминокислотные остатки в этих участках, вероятно, оказывают некоторое влияние на термостабильные свойства исследуемого фермента.

Таким образом, в ходе проделанной работы ген, кодирующий термостабильную амилазу, синтезируемую бактериями штамма *Bacillus* sp. 406, клонирован в клетках *E. coli*. Продукт клонированного гена экспрессируется в клетках *E. coli*. Была определена нуклеотидная последовательность данного гена и обнаружены предполагаемые последовательности, участвующие в регуляции его экспессии. Анализ аминокислотной последовательности амилазы штамма *Bacillus* sp. 406 показал, что фермент имеет все основные структурные особенности α -амилаз. Также сделаны некоторые предположения о влиянии первичной структуры фермента на его температурную устойчивость.

Список литературы

1. Olempska-Beer Z.S., Merker R.I., Ditto M.D., DiNovi M.J. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms // Regul. Toxicol. Pharmacol.–2006.–Vol. 45, № 2.–P. 144–158.
2. Nielsen J.E., Borchert T.V. Protein engineering of bacterial α -amylases // Biochim. Biophys. Acta.–2000.–Vol. 1543, № 2.–P. 253-274.
3. Machius M., Wiegand G., Huber R. Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* α -amylase at 2.2 Å resolution // J. Mol. Biol.–1995.–Vol. 246, № 4.–P. 545-559.
4. Качан А.В., Русь О.Б., Евтушенков А.Н. Выделение и характеристика штамма *Bacillus* sp. 406, продуцирующего термостабильную амилазу // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: материалы VI Междунар. науч. конф., Минск, 2-6 июня 2008 г. Мн., 2008. С. 147-149.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.-М.: Мир, 1984.–399 с.
6. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Res.-1997.-Vol. 25.-P. 3389-3402.
7. Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S., von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites // Prot. Eng.–1997.–Vol. 10.–P. 1-10.
8. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D., Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server // The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press.-2005.-P. 571-607.
9. Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // Nucleic Acids Research.- 1997.-Vol. 25. - P. 4876-4882.
10. Kelley L. A., Sternberg M. J. E. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server // Nature Protocols.-2009.-Vol. 4.-P. 363 - 371.

11. Fitter J. Structural and dynamical features contributing to thermostability in α -amylases // Cell. Mol. Life Sci.–2005.–V. 62, № 17.–P. 1925–1937.
12. Nakajima R., Imanaka T., Aiba S. Nucleotide Sequence of the *Bacillus stearothermophilus* α -Amylase Gene. // J. Bacteriol.–1985.–Vol. 163, № 1. - p. 401-406.
13. Voskuil M.I., Chambliss G.H. The –16 region of *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacterial promoters // Nucleic Acids Research.–1998.–Vol. 26, № 15.–P.3584-3590.
14. Fujita Y. Carbon Catabolite Control of the metabolic network in *Bacillus subtilis* // Biosci. Biotechnol. Biochem.–2009.–Vol. 73, № 2.–P. 245-259.
15. Simonen M., Palva I. Protein secretion in *Bacillus* species // Microbiol. Rev.–1993.–Vol. 57, №. 1.–P. 109-137.
16. Declerck N., Machius M., Joyet P., Wiegand G., Huber R., Gaillardin C. Hyperthermostabilization of *Bacillus licheniformis* α -amylase and modulation of its stability over a 50 °C temperature range // Protein Eng.–2003.–V. 16, № 4.–P. 287–293.
17. Shaw A., Bott R., Day A.G. Protein engineering of α -amylase for low pH performance // Curr. Opin. Biotechnol.–1999.– Vol. 10.–P. 349-352.