

УДК 577.151.4

Мутация остатка β F71 в структуре пенициллинацилазы из *Escherichia coli* приводит к улучшению энантиоселективности и каталитических свойств

И.В. Шаповалова¹, В.Б.Л. Алкема², О.В. Ямскова¹, Э. де Врис², Д.Ф. Гуранда¹,
Д.Б. Янссен², В.К. Швядас^{1*}

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ

²Факультет биохимии, Гронингский институт биомолекулярных наук и биотехнологии, Университет Гронингена, Ниенборг 4, 9747 АГ Гронинген, Нидерланды

* E-mail: vytas@belozersky.msu.ru

РЕФЕРАТ Остаток фенилаланина в положении 71 β -цепи пенициллинацилазы из *E.coli* играет важную роль в связывании и хиральной дискриминации субстрата. В положение β F71 были введены различные аминокислотные остатки и исследована энантиоселективность и субстратная специфичность полученных мутантов. Для ряда мутантов обнаружено значительное увеличение каталитической активности. Введение мутаций в положение β F71 приводило также к увеличению энантиоселективности пенициллинацилазы. Каталитическая активность по отношению к специфическим субстратам увеличивалась до 36 раз, наиболее сильный эффект наблюдали в случае К-, R- и L-мутантов. Увеличение активности по отношению к производным D-фенилглицина, представляющее собой практически важное улучшение специфичности с точки зрения биокаталитического синтеза новых пенициллинов и цефалоспоринов, обнаружено для β F71R и β F71L-мутантов. Синтетическая активность пенициллинацилазы при использовании 6-аминопенициллановой кислоты в качестве внешнего нуклеофила была особенно чувствительна к мутации остатка β F71 в отличие от реакций ферментативного ацильного переноса на 7-аминодезацетоксицефалоспорованую кислоту.

Ключевые слова: пенициллинацилаза; β F71 мутанты; энантиоселективность; увеличение каталитической активности фермента.

ВВЕДЕНИЕ

Пенициллинацилаза из *Escherichia coli* является наиболее изученным ферментом из недавно открытой группы Ntn-гидролаз. Для ферментов этого семейства характерен уникальный каталитический механизм, в котором N-концевой аминокислотный остаток (серин, цистеин или треонин) выступает в качестве нуклеофила, образуя промежуточный ацилфермент. ПАЗы, так же как и другие Ntn-гидролазы, активируются в результате процессинга белка-предшественника, образуя нативный фермент, имеющий в области активного центра характерный $\alpha\beta$ мотив [1]. Несмотря на большой интерес к структуре и биосинтезу пенициллинацилаз [2–13], а также к новым областям их применения в биокатализе [14–20], субстратная специфичность и особенно энантиоселективность фермента изучены лишь в нескольких работах [21, 22]. Это обу-

словлено тем, что изучение субстратной специфичности по отношению к фенилацетильным производным осложняется сильное конкурентное ингибирование продуктом реакции фенилуксусной кислотой [23, 24]. По-видимому, ПАЗы могут превращать более широкий спектр субстратов, чем предполагалось ранее (особенно по отношению к входящей группе), и ферменты из разных источников могут обладать существенно отличающейся каталитической активностью и энантиоселективностью [24]. Субстратная специфичность и каталитические свойства ПАЗ представляют большой практический интерес, поскольку ферменты этого семейства играют ключевую роль в биокаталитическом получении полусинтетических β -лактамных антибиотиков [25].

Определение кристаллографических структур нативного фермента [2, 10] и аналогов фермент-субстратного комплекса [12, 13] привело к прорыву в установлении

каталитического механизма ПА из *E.coli*. Это предоставило первую информацию об аминокислотных остатках, вовлеченных в связывание уходящей группы субстрата. Применение методов молекулярного моделирования в дальнейшем помогло раскрыть более тонкие детали связывания субстрата в активном центре пенициллинацилазы [26]. Были обнаружены дополнительные взаимодействия уходящей группы субстрата с остатками β G385, β S386 и β N388, которые отсутствовали в кристаллографических структурах. На основании информации о структуре и данных молекулярного моделирования были определены ключевые аминокислотные остатки, контролирующие взаимодействия между ферментом и субстратом. Понимание этого является принципиально важным для рационального дизайна основных биокаталитических свойств, таких как субстратная специфичность, энантиоселективность и каталитическая активность. Было показано, что остаток F71 β -цепи пенициллинацилазы является одним из основных аминокислотных остатков, взаимодействующих с уходящей группой субстратов. Таким образом, этот остаток представляет собой привлекательную мишень для мутагенеза, если мы хотим изменить каталитический потенциал пенициллинацилазы в процессах биокаталитической модификации β -лактамовых антибиотиков, получения хиральных аminosоединений и в других областях. В этой статье мы представляем результаты по изменению принципиально важных свойств ПА из *E.coli*: увеличению энантиоселективности и повышению каталитической активности. Эти изменения были достигнуты путем мутации одного аминокислотного остатка (β Phe71) в активном центре фермента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мутагенез остатка β F71 выполняли путем трех последовательных ПЦР. В первой стадии использовали BSTfw праймер, 5'-CAGGG AAGA ACCGGGAA AСТАТТG-3' в качестве прямого праймера и обратный праймер F71rv, содержащий мутацию в кодоне остатка β F71, 5'-AAAAАТАТCGACATCGTCGCCXXXACСТGCCGT-3'.

Подчеркнут кодон, отвечающий за остаток β F71. Во второй стадии использовали F71fw 5'-GGCGACGATGTCGATATTTTТТ-3' в качестве прямого праймера и NHErv 5'-САСТССТGCCAATTTTТТGGCСТТC-3' в качестве обратного праймера. Конечные продукты двух реакций отделяли в 2 %-ном агарозном геле и использовали затем в третьей стадии (без последовательностей, отвечающих нативному ферменту) ПЦР с добавлением праймеров NHErv и BSTfw. Конечные продукты, содержащие мутации в позиции β F71, разрезали для получения липких концов с помощью рестриктаз BstX1 and NheI и сшивали лигазой T4 в плазмиду pEC, расщепленную теми же ферментами. Полученную мутантную плазмиду использовали для трансформации компетентных клеток *E.coli*, согласно методике [27]. Полученные в результате трансформации последовательности секвенировали для подтверждения правильности мутации и отсутствия вторичной мутации по другому остатку. Экспрессию и очистку мутантов проводили так же, как для нативной пенициллинацилазы согласно [12].

Концентрацию активных центров пенициллинацилазы определяли титрованием с фенолметилсульфонилфторидом, как описано ранее [28]. Кинетические исследования проводили, анализируя начальные скорости соответствующих реакций, как описано в публикациях [24, 30]. Энантиоселективность (E) нативной пенициллинацилазы и ее мутантов определяли как соотношение констант скорости мутантов порядка, определенных при гидролизе индивидуальных энантиомеров, $E = (k_{cat}/K_m)^L / (k_{cat}/K_m)^D$, по методике, описанной ранее [21, 24].

При применении методов молекулярной динамики использовали пакет Gromacs (www.gromacs.org), расчеты проводили, как описано в работе [26]. При молекулярном моделировании в качестве основы использовали кристаллическую структуру 1H2G-мутанта β F71 [29]. Молекулярный докинг был выполнен с использованием программы Lead-Finder компании ООО «МолТех», Россия (www.moltech.ru).

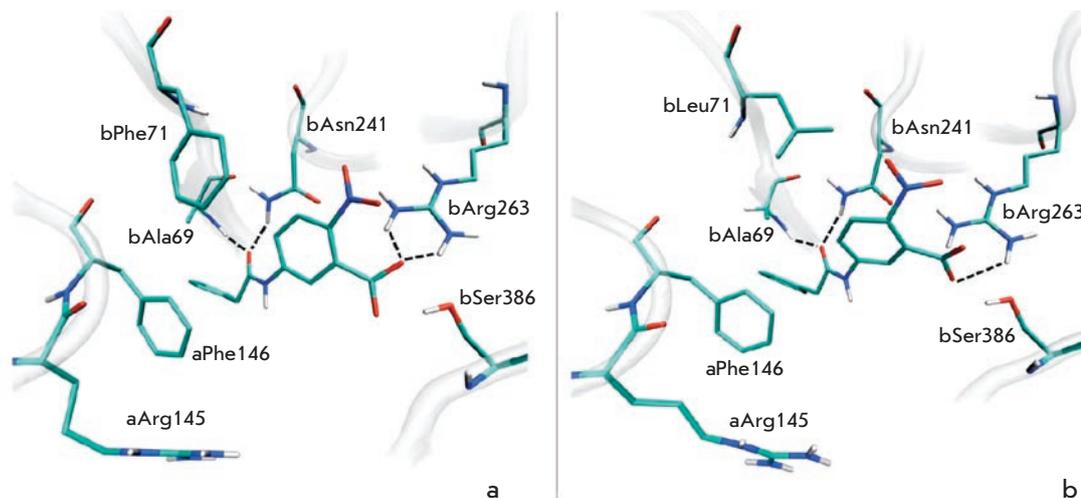


Рис. 1. Молекулярное моделирование фермент-субстратных комплексов для нативной пенициллинацилазы (а) и ее β F71L-мутанта (б) с N-(3-карбоксы-4-нитрофенил)фенилацетамидом. Взаимодействия субстрата с остатками оксианионного центра (β A69 и β N241) и остатком β R263 отмечены пунктирными линиями

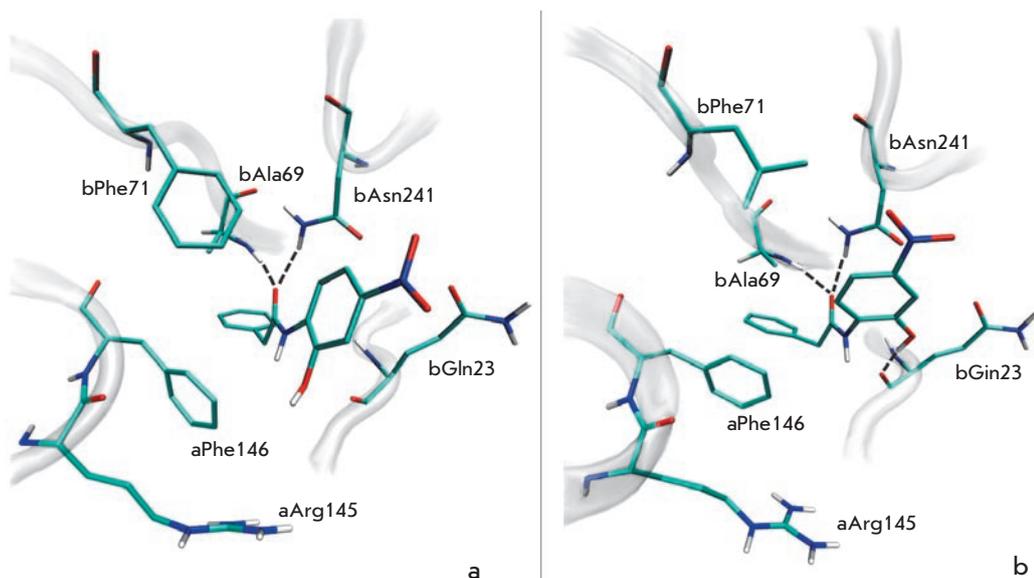


Рис. 2. Молекулярное моделирование фермент-субстратных комплексов для нативной пенициллинацилазы (а) и ее β F71L-мутанта (б) с N-(2-гидрокси-4-нитрофенил)фенилацетамидом. Взаимодействия субстрата с остатками оксианионного центра (β A69 и β N241) и остатком β Q23 отмечены пунктирными линиями

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аминокислотный остаток F71 β -цепи слегка сдвигается при связывании пенициллина G в активном центре пенициллинацилазы и располагается в непосредственной близости от β -лактамного кольца, образуя Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия. Молекулярное моделирование показывает, что остаток β F71 играет важную роль и в связывании других субстратов, например N-(3-карбокситетрагидрофурил)фенилацетамида (рис. 1а) и N-(2-гидрокси-4-нитрофенил)фенилацетамида (рис. 2а). Более того, мутация по этому аминокислотному остатку (рис. 1б и 2б) изменяет ориентацию субстрата и усиливает взаимодействия субстрата с оксианионным центром. Поэтому следовало ожидать, что мутация по остатку β F71 может увеличить каталитическую активность пенициллинацилазы и изменить стереоселективность, так же как и специфичность фермента по отношению к уходящей группе. Для проверки этого предположения были получены β F71-мутанты, содержащие различные функциональные группы в боковой цепи, и исследованы такие их свойства, как энантиоселективность и каталитическая активность по отношению к субстратам различной химической структуры. Все мутанты были каталитически активны, что свидетельствовало о том, что мутация по остатку β F71 не влияет на процессинг и правильное сворачивание мутантных ферментов. Фенилметилсульфонилфторид – хорошо известный необратимый ингибитор и реагент для титрования активных центров пенициллинацилазы [24, 28] был использован для определения концентрации активных центров мутантных ферментов. Титрование активных центров нативной пенициллинацилазы и ее мутантов позволило определить абсолютную каталитическую активность каждого биокатализатора и сравнить их каталитические свойства. Кинетические исследования включали измерение каталитической активности в реакции гидролиза фенилацетильных производных с различными, но структурно близкими уходящими группа-

ми, а также α -аминозаместителем в ацильной группе. Энантиоселективность мутантов в реакции гидролиза N-фенилацетильных производных аминокислот использовалась в качестве количественной меры хиральной дискриминации в области связывания уходящей группы. Наиболее значимые изменения, вызванные мутацией по аминокислотному остатку β F71, представлены ниже.

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МУТАНТОВ

Для сравнения каталитической эффективности действия нативной пенициллинацилазы и ее мутантов были проведены кинетические исследования гидролиза субстратов – производных фенилуксусной кислоты и D-фенилглицина, структура которых приведена на рис. 3. Видно, что при мутации остатка β F71 каталитическая активность пенициллинацилазы меняется очень сильно (рис. 4). Как и ожидалось, мутация меняет специфичность фермента по отношению к уходящей группе субстрата. Большинство из проверен-

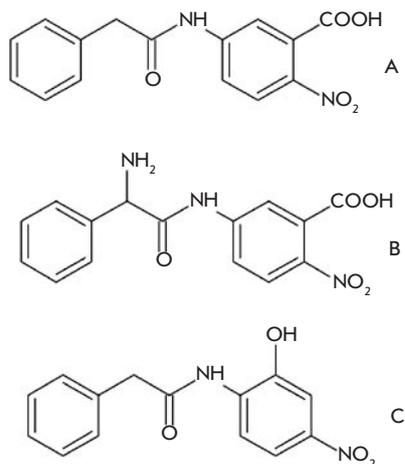


Рис. 3. Структура субстратов пенициллинацилазы, использованных для тестирования каталитической активности нативного фермента и его мутантов

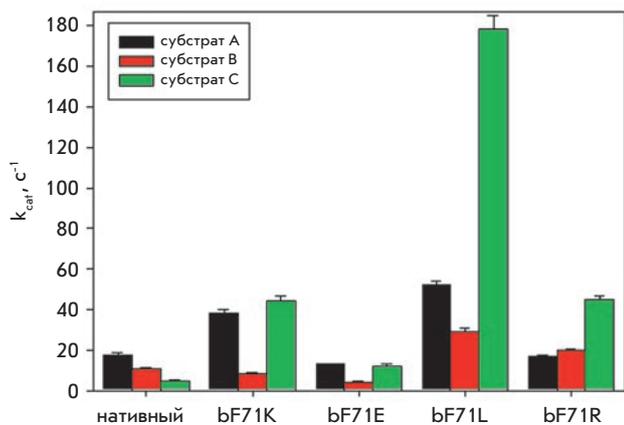


Рис. 4. Каталитическая активность нативной пенициллинацилазы и ее βF71-мутантов, выраженная как величины каталитических констант ферментативного гидролиза субстратов, представленных на рис. 3

ных нами мутантов показало увеличение каталитической активности, но это имело место только по отношению к выбранным субстратам. Наибольшее увеличение каталитической активности наблюдали в случае К-, R- и L-мутантов, в то время как в случае E-мутанта улучшение каталитических свойств было менее заметным. Для мутанта βF71E наблюдали также пониженное сродство к изучаемым субстратам. Из всех протестированных соединений наибольшее значение k_{cat} было показано для мутанта βF71L, что соответствует увеличению каталитической активности более чем в 36 раз по сравнению с нативной пенициллинацилазой.

К-, R- и L-мутанты обладали не только более высокой каталитической активностью по сравнению с натив-

ной пенициллинацилазой, но и более высоким сродством к субстратам (данные не приведены). Это показывает, что фенилаланин в положении 71 не является оптимальным аминокислотным остатком ни с точки зрения каталитической активности, ни с точки зрения сродства фермента к субстратам. Обнаружено также, что мутация по остатку βF71 приводит к изменению свойств участка связывания ацильной группы и улучшает специфичность пенициллинацилазы по отношению к производным D-фенилглицина, которые являются донорами ацильной части при ферментативном синтезе наиболее важных полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов, таких как ампициллин и цефалексин. Поиск ферментов, обладающих более высокой специфичностью к производным D-фенилглицина, имеет длительную историю [31–33], и никто не ожидал, что специфичность пенициллинацилазы из *E.coli* по отношению к этой группе соединений может быть улучшена. Тем не менее мутант βF71L показал более высокую специфичность, чем нативный фермент (значение k_{cat}/K_m увеличивается в 4.4 раза), что происходит как в результате увеличения каталитической активности, так и улучшения сродства к субстрату. Становится очевидным, что природа «оптимального» остатка в положении β71 зависит от структуры превращаемого ферментом субстрата. Наши результаты явно указывают, что мутация по остатку βF71 может быть использована для дизайна мутантных пенициллинацилаз с улучшенными каталитическими свойствами.

РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ НУКЛЕОФИЛА

Наиболее прямым количественным путем изучения эффекта мутации на связывание β-лактамного ядра при синтезе новых β-лактамных антибиотиков, катализируемом пенициллинацилазой, было бы измерение соответствующих констант связывания. Однако определение константы связывания нуклеофила на соответствующем участке активного центра фермента не представляется возможным ввиду сложной

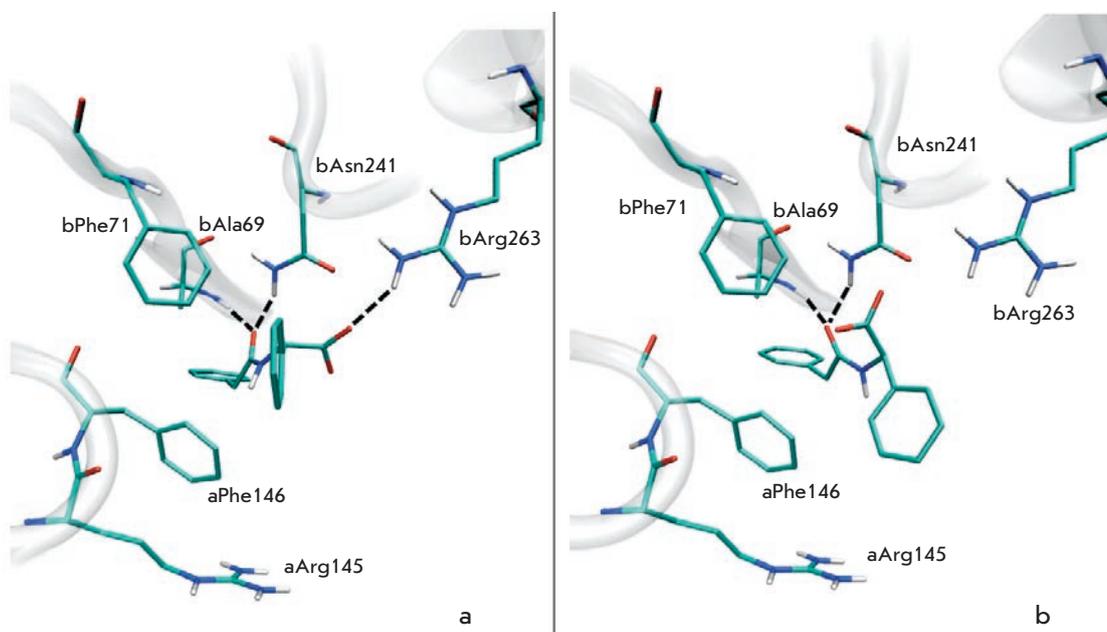


Рис. 5. Молекулярное моделирование фермент-субстратных комплексов нативной пенициллинацилазы с N-фенилацетил-L-фенилглицином (а) и N-фенилацетил-D-фенилглицином (б). Взаимодействия L-формы и D-формы с остатками оксианионного центра (βA69 и βN241) отмечены пунктирными линиями. Взаимодействия субстрата с остатком βR263 наблюдаются только для L-формы субстрата

Таблица 1. Соотношение начальных скоростей синтеза и гидролиза $(S/H)_{in}$ при синтезе ампициллина, амоксициллина и цефалексина, катализируемом нативной пенициллинацилазой и ее β F71-мутантами, с использованием амидов D-фенилглицина (D-ФГА) и D-п-оксифенилглицина (D-ОФГА) в качестве доноров ацильной группы

Фермент	D-ФГА/7-АДЦК	D-ФГА/6-АПК	D-ОФГА/6-АПК
нативный	9 ± 2	1.9 ± 0.1	1.2 ± 0.04
β F71Y	7.5 ± 0.4	0.74 ± 0.01	0.61 ± 0.03
β F71L	4.9 ± 0.4	0.94 ± 0.04	0.86 ± 0.03
β F71W	2.9 ± 0.2	0.77 ± 0.05	0.62 ± 0.03
β F71R	1.8 ± 0.03	0.76 ± 0.01	0.45 ± 0.01
β F71K	1.2 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.46 ± 0.02

Условия эксперимента: pH 7.0, 25 °C, 0.05 М фосфатный буфер, концентрация D-ФГА и D-ОФГА – 0.015 М, 6-АПК и 7-АДЦК – 0.025 М

кинетики реакций ацильного переноса, катализируемых ПА (возможно лишь определение комплексного кинетического параметра, куда входит значение константы связывания нуклеофила) [34]. Теоретический анализ показал, что наиболее адекватно взаимодействие нуклеофила с ферментом можно характеризовать как соотношение начальных скоростей синтеза и гидролиза $(S/H)_{in}$, изучая его зависимость от концентрации нуклеофила [35]. Исходя из этого было проведено кинетическое исследование с двумя различными донорами ацильной части и двумя нуклеофилами – ядрами β -лактамных антибиотиков 6-аминопенициллановой кислотой (6-АПК) или 7-аминодезацетоксифалоспоровановой кислотой (7-АДЦК). Результаты проведенного исследования показывают, что реакционная способность 6-АПК значительно более чувствительна к природе аминокислотного остатка в положении β F71 по сравнению с 7-АДЦК (табл. 1). Очевидно, мутация остатка β F71, особенно замена фенилаланина на заряженный аминокислотный остаток, приводит к существенным изменениям в связывании β -лактамного кольца, и, в результате, меняется специфичность участка связывания уходящей группы.

ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОСТЬ

Поскольку остаток β F71 располагается в области связывания уходящей группы субстрата, его мутация должна влиять на реакционную способность фермента по отношению к стереохимическим изомерам хиральных субстратов. При изучении этого эффекта в качестве количественного параметра мы выбрали величину энантиоселективности действия фермента E (соотношение значений k_{cat}/K_m гидролиза L- и D-энантиомеров субстрата) в реакции гидролиза N-фенилацетилных производных аминокислот. Хотя для нативной ПА характерна очень хорошая хиральная дискриминация по отношению к энантиомерам N-фенилацетил-фенилглицина благодаря ориентации L-формы субстрата в активном центре фермента при помощи остатка β R263 (рис. 5), возможно дальнейшее увеличение энантиоселективности фермента (рис. 6). Было обнаружено, что мутант β F71L, который обладал наиболее

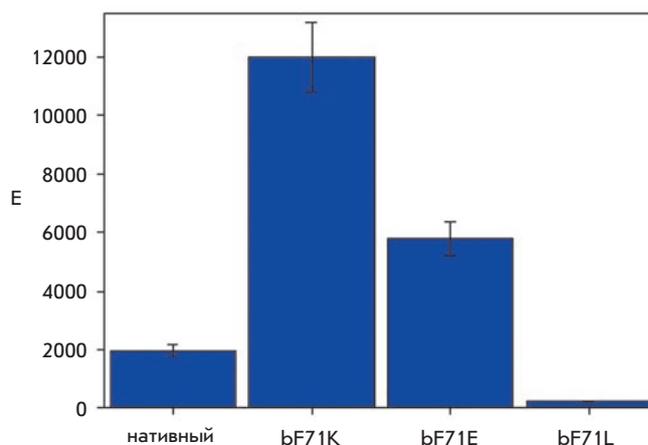


Рис. 6. Энантиоселективность (E) нативной пенициллинацилазы и ее мутантов в реакциях гидролиза N-фенилацетил-фенилглицина, рассчитываемая как соотношение $(k_{cat}/K_{m,L}) / (k_{cat}/K_{m,D})$

высокой каталитической активностью, характеризуется энантиоизбирательностью, меньшей по сравнению с нативным ферментом почти на один порядок, в то время как мутанты β F71E и β F71K обладают энантиоселективностью, большей в 3 и 6 раз соответственно. Положительный эффект мутации (т.е. высокая энантиоселективность) связан с уменьшением сродства к «низкоактивному» D-стереоизомеру, а отрицательный эффект вызван изменением реакционной способности обоих стереоизомеров (данные не показаны). Изучение энантиоселективности мутантов, так же как и их каталитической активности, показало, что каталитические свойства пенициллинацилазы могут быть тонко настроены путем мутации остатка β F71 в соответствии с решаемой задачей и структурой превращаемого субстрата.

ВЫВОДЫ

Природа остатка в положении β F71 в структуре пенициллинацилазы из *E. coli* оказывает сильное влияние на каталитическую активность фермента и его способность к хиральной дискриминации энантиомеров субстрата. В зависимости от структуры превращаемого соединения мутации по остатку β F71 могут ухудшить или улучшить каталитическую активность, энантиоселективность, а также сродство к субстрату. Одновременное улучшение всех основных каталитических свойств фермента для использования в биокатализе вряд ли представляется возможным, и фермент может быть тонко настроен для решения конкретной задачи в зависимости от структуры субстрата. Наличие информации о взаимосвязи структура/функция в семействе пенициллинацилаз, роли отдельных остатков и молекулярное моделирование могут облегчить дизайн пенициллинацилаз для различных биотехнологических задач. ●

Работа была выполнена при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (государственный контракт 02.527.11.0001), программы ФП7 (совместный проект ЕС-РФ IRENE) и Министерства экономики Нидерландов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Oinonen C., Rouvinen J. // *Protein Sci.* 2000. V. 9, P. 2329–2337.
2. Duggleby H.J., Tolley S.P., Hill C.P., Dodson E.J., Dodson G., Moody P.C.E. // *Nature.* 1995. V. 373. P. 264–268.
3. Brannigan J.A., Dodson G., Duggleby H.J., Moody P.C., Smith J.L., Tomchik D.R., Murzin A.G. // *Nature*, 1995, V. 378, P. 416–419.
4. Isupov M.N., Obmolova G., Butterworth S., Badet-Denisot M.A., Badet B., Polikarpov I., Littlechild J.A., Teplyakov A. // *Structure.* 1996. V. 4. P. 801–810.
5. Groll M., Ditzel L., Lowe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H.D., Huber R. // *Nature.* 1997. V. 386. P. 463–471.
6. Guo H.C., Xu Q., Buckley D., Guan C. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 20205–20212.
7. McDonough M.A., Klei H.E., Kelly J.A. // *Protein Sci.* 1999. V. 8. P. 1971–1981.
8. Suresh C.G., Pundle A.V., Rao K.N., SivaRaman H., Brannigan J.A., McVey C.E., Verma C.S., Dauter Z., Dodson E.J., Dodson G.G. // *Nature Struct. Biol.* 1999. V. 6. P. 414–416.
9. Schumacher G., Sizmann D., Haug H., Buckel P., Bock A. // *Nucleic Acid Res.* 1986. V.14. P. 5713–5727.
10. Done S.H., Brannigan J.A., Moody P.C.E., Hubbard R.E. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 284. P. 463–475.
11. Hewitt L., Kasche V., Lummer K., Lewis R.J., Murshudov G.N., Verma C.S., Dodson G.G., Wilson K.S. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 302. P. 887–898.
12. Alkema W.B.L., Hensgens C.M.H., Kroezinga E.H., De Vries E., Floris R., Van der Laan J.-M., Dijkstra B.W., Janssen D.B. // *Protein Eng.* 2000. V. 13. P. 857–863.
13. McVey C.E., Walsh M.A., Dodson G.G., Wilson K.S., Brannigan J.A. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 313. P. 139–150.
14. Baldaro E., D'Arrigo P., Pedrocchi-Fantoni G., Rosell C.M., Servi S., Tagliani A., Terreni M. // *Tetrahedron: Asymmetry.* 1993. V. 4. P. 1031–1034.
15. Waldmann H., Sebastian D. // *Chem. Rev.* 1994. V. 94. P. 911–937.
16. Soloshonok V.A., Soloshonok I.V., Kukhar V.P., Švedas V.K. // *J. Org. Chem.* 1998. V. 63. P. 1878–1884.
17. Topgi R.S., Ng J.S., Landis B., Wang P., Behling J.R. // *Bioorg. Med. Chem.* 1999. P. 2221–2229.
18. Basso A., De Martin L., Ebert C., Gardossi L., Linda P. // *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* 2001. V. 16. P. 73–80.
19. Guranda D.T., Van Langen L.M., Van Rantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. // *Tetrahedron: Asymmetry.* 2001. V. 12. P. 1645–1650.
20. Guranda D.T., Khimiuk A.I., Van Langen L.M., Van Rantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. // *Tetrahedron: Asymmetry.* 2004. V. 15. P. 2901–2906.
21. Švedas V.K., Savchenko M.V., Beltser A.I., Guranda D.F. // *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1996. V. 799. P. 659–669.
22. Galunsky B., Lummer K., Kasche V. // *Monatsh. Chem.* 2000. V. 131. P. 623–632.
23. Березин И.В., Клесов А.А., Ныс П.С., Савицкая Е.М., Швядас В.К. // *Антибиотики.* 1974. Т. 19. С. 880–887.
24. Švedas V.K., Guranda D.T., Van Langen L.M., Van Rantwijk F., Sheldon R.A. // *FEBS Lett.* 1997. V. 417. P. 414–418.
25. Bruggink A., Roos E.C., De Vroom E. // *Org. Process Res. Dev.* 1998. V. 2. P. 128–133.
26. Чилов Г.Г., Строганов О.В., Швядас В.К. // *Биохимия*, 2008. Т. 73. № 1. С. 69–79.
27. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
28. Швядас В.К., Марголин А.Л., Шерстюк С.Ф., Клесов А.А., Березин И.В. // *Биоорганическая химия.* 1977. № 3. С. 546–554.
29. Morillas M., McVey C.E., Brannigan J.A., Ladurner A.G., Forney L.G., Virden L. // *Biochem. J.* 2003. V. 371. P. 143–150.
30. Юшко М.И., Шамолина Т.А., Гуранда Д.Ф., Синев А.В., Швядас В.К. // *Биохимия.* 1998. Т. 63. № 9. С. 1295–1300.
31. Takahashi T., Yamazaki Y., Kato K., Isona M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1972. V. 94. P. 4035–4037.
32. Blinkovsky A.M., Markaryan A.N. // *Enzyme Microb. Technol.* 1993. V. 15. P. 965–973.
33. Polderman-Tijmes J.J., Jekel P.A., van Merode A., Floris T.A.G., van der Laan J.-M., Sonke T., Janssen D.B. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 211–218.
34. Юшко М.И., Швядас В.К. // *Биохимия.* 2000. Т. 65. № 12. С. 1624–1633.
35. Youshko M.I., Chilov G.G., Shcherbakova T.A., Svedas V.K. // *Biochim. Biophys. Acta: Proteins & Proteomics.* 2002. V. 1599. № 1–2. P. 134–140.