

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.67; 577.15; 615.33

А. М. Балаян¹, Л. С. Манукян¹, академик Э. К. Африкян²,
В. А. Абелян³

Изучение активного центра цикломальтодекстрин
глюканотрансферазы штамма *Thermostreptomyces sp.*
методами фотоокисления и модификации
диэтилпирокарбонатом

(Представлено 4/II 2015)

Ключевые слова: цикломальтодекстрин глюканотрансфераза, *Thermostreptomyces sp.*, активный центр фермента, фотоокисление, диэтилпирокарбонат, циклодекстрин.

В предыдущих работах по изучению механизма действия цикломальтодекстрин глюканотрансфераз (ЦГТ; КФ 2.4.1.19) различных групп микроорганизмов было выявлено, что активный центр ЦГТ состоит из двух отдельных участков – акцепторного и донорного. Необходимым условием для циклизации является взаимодействие субстрата с обоими участками одновременно [1-4].

Установлено также, что активный центр бациллярных ЦГТ имеет большую гомологию с α -амилазами [5-8]. Аналогично α -амилазам ЦГТ состоит из четырех глобулярных участков, из которых А и В идентичны таковым α -амилаз, в то время как участки С и D являются характерными только для ЦГТ [9, 10]. Для циклизации мальтоолигосахаридов важную роль играет COOH -концевой участок фермента [11-13], однако показано также немаловажное значение NH_2 -участка [14].

Нами впервые выявлены продуценты ЦГТ среди термофильных актиномицетов [3]. В настоящей работе обобщены результаты по изучению активного центра ЦГТ *Thermostreptomyces sp.* ИНМИА-А-561 методами фотоокисления и модифицирования диэтилпирокарбонатом (ДЭПК).

Методы исследования. В качестве продуцента ЦГТ использовали культуру *Thermostreptomyces sp.* ИНМИА-А-561, выращивание которой осуществляли по ранее описанной методике [3].

Очистка фермента и его основная характеристика описаны в [3].

Фотоокисление ЦГТ осуществляли при различных значениях рН и температуры в присутствии 25 мкМ метиленовой сини при 20°, освещая

пробы лампы дневного света мощностью 150 Вт на расстоянии 10 см. Контролем служили пробы с той же концентрацией фотосенсибилизатора, но находившиеся в темноте, а также образцы, освещавшиеся тем же источником света, но в отсутствие метиленовой сини [15, 16].

Модификацию диэтилпирокарбонатом осуществляли методом Майлза [17]. Для этого к 20.2 мкМ (1.13 мг/мл) раствора ЦГТ в 0.02 М фосфатном буфере, рН 6.2, содержащем 1 мМ CaCl₂, добавляли 100-кратный молярный избыток ДЭПК в абсолютном этаноле и регистрировали прирост поглощения при 240 нм, характеризующий образование *N*-этоксиформилимидазола.

В экспериментах в присутствии эффекторов концентрация салицина и акарбозы была 5 мМ, а количество полимера β-ЦД – 2 мг/мл. Для расчета числа модифицированных остатков использовали коэффициент молярной экстинкции *N*-карбэтоксигистидина, равный 3200 М⁻¹ см⁻¹ [18] по формуле [19]

$$n = \Delta A_{240} / 1 \cdot 20.2 \cdot 10^{-6} \cdot 3200,$$

где ΔA_{240} – [A_{240} (с ЦГТ) – A_{240} (без ЦГТ)] через 40 мин; 1.0 – ширина реакционной ячейки, см; $20.2 \cdot 10^{-6}$ – молярная концентрация ЦГТ. Реактивацию модифицированной ЦГТ осуществляли добавлением 0.5 М раствора гидроксилamina (рН 7.0).

Определение рК диссоциирующихся групп, принимающих участие в каталитическом акте ЦГТ, проводили согласно описанному методу [20].

Циклизирующую активность ЦГТ определяли метилоранж-мальто-триозным методом [21]. За единицу активности принимали количество фермента, которое продуцировало 1 мкмоль ЦД в 1 мин в условиях эксперимента.

Декстринизирующую активность определяли согласно описанному методу [22]. За единицу активности принимали количество фермента, которое за 10 мин в заданных условиях реакции конвертировало 50% крахмала.

α-ЦД специфическую активность идентифицировали с применением метилоранжа [23]. Реакционную смесь (3 мл), содержащую 0.6 мл 5% крахмала в 0.05 М фосфатном буфере (рН 7.0), 0.1 мл 1 мМ метилоранжа в том же буфере, 2 мл того же буфера и 0.3 мл ферментного раствора, инкубировали при 40° в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 0.15 мл 6 н HCl, оставляли при 15-16°С в течение 30 мин и экстинкцию определяли на спектрофотометре СФ-46 при 505 нм.

β-ЦД специфическую активность определяли по известному методу с применением фенолфталеина [24].

Количества различных ЦД определяли методом ВЭЖХ в ранее приведенных условиях [2].

Белок определяли по Лоури [25], используя БСА в качестве стандарта.

Полимер β-ЦД готовили по ранее описанному методу [26].

В работе использовали крахмал, ДЭПК и ЦД производства “Serva” (Германия), салицин – “Aldrich” (США), акарбозу – “Bayer” (Германия), а также реактивы отечественного производства.

Результаты и их обсуждение. 1. Определение pK диссоциирующих групп активного центра ЦГТ *Thermostreptomyces sp. ИНМИА-А-561.* Широко используемым методом для получения предварительных данных при идентификации функциональных групп активного центра является анализ зависимости активности фермента от pH. В данном случае такая кривая, а также $v=f(pH)$ имеют колоколообразную форму с оптимумом при pH 5.5, что свидетельствует об участии в катализе двух функциональных групп (рис. 1), константы ионизации для которых равны $pK_1=3.9$ и $pK_2=6.1$, что соответствует pK карбоксильной группы активного центра фермента и pK имидазольной группы гистидина [20].

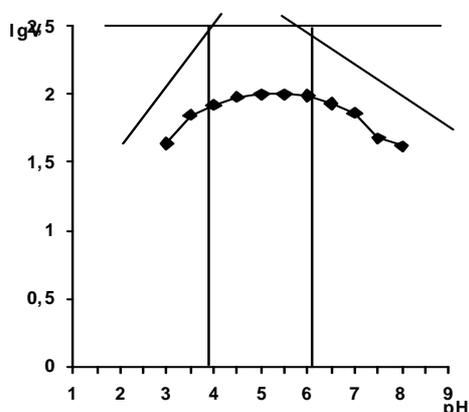


Рис. 1. Зависимость начальной скорости реакции от pH.

Для доказательства этого была определена теплота ионизации данных функциональных групп по уравнению Вант-Гоффа

$$\Delta H = 2.303R (pK'_2 - pK'_1) \cdot (T_1 \cdot T_2) / (T_2 - T_1),$$

где K'_1 и K'_2 – константы ионизации группы при температурах T_1 и T_2 ; R – универсальная газовая постоянная, равная 8.31 кДж/моль.

В табл.1 суммированы результаты опытов по сдвигу pK_1 и pK_2 в зависимости от температуры. Теплота ионизации для pK_1 , рассчитанная из кривой зависимости pK_1 от $1/T$ по формуле

$$\Delta H = tg\beta \cdot 2.303 \cdot R,$$

была равна 5740 кал/моль, что хорошо согласуется со значением теплоты ионизации карбоксильной группы [16].

Таблица 1

Влияние температуры на изменение величины рК групп активного центра ЦГТ *Thermostreptomyces sp.* ИНМИА-А-561

Температура, К	рК ₁	рК ₂
293	3.7	5.7
303	3.8	5.9
313	3.9	6.1
318	4.0	6.4

2. Фотоокисление функциональных групп ЦГТ в присутствии метиленовой сини. Типичной реакцией на имидазольную группу гистидина является ее фотоокисление в присутствии метиленовой сини, играющей роль фотосенсибилизатора [15]. Фотоокисление приводит к разрыву гетероцикла имидазола и к инактивации фермента. Результаты экспериментов показали, что ЦГТ подвергается интенсивной фотоинактивации (рис. 2). Тот факт, что с увеличением рН, т.е. с уменьшением концентрации Н⁺-ионов в среде, скорость фотоинактивации возрастает, опять же указывает на имидазольную группу гистидина, которая, как известно, выполняет роль “ловушки” протонов [27]. Такими свойствами ни фенольное кольцо тирозина, ни индольная группа триптофана, которые также способны фотоокисляться, но с меньшей скоростью, не обладают [28, 29].

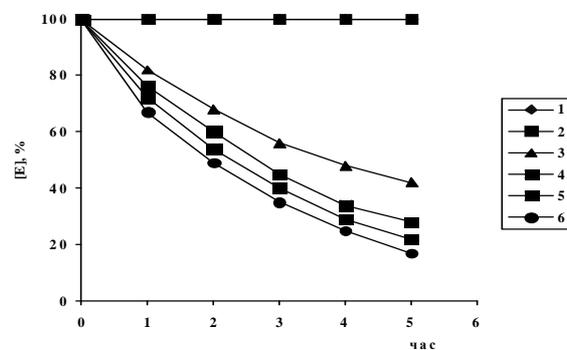


Рис. 2. Инактивация ЦГТ *Thermostreptomyces sp.* ИНМИА-А-561 фотоокислением при различных рН: 1 – без метиленовой сини в темноте при рН 7.0; 2 – с метиленовой синью на свету; 3 – инактивация при рН 5.0; 4 – рН 5.7; 5 – рН 7.0; 6 – рН 8.0.

При высокой концентрации в среде Н⁺-ионов имидазольная группа положительно заряжена, что является препятствием для отдачи электронов под действием фотонов света. С увеличением рН среды имидазольная группа отдает протоны и пропорционально растет скорость фотоокисления группы. При этом зависимость $\lg[E_0]/[E]$ от времени τ является линейной.

ной (рис. 3) и процесс фотоинактивации относится к реакции первого порядка и описывается уравнением

$$k = 2.303/\tau \cdot \lg[E_0]/[E],$$

где k – константа скорости инактивации, ч^{-1} ; $[E_0]$ и $[E]$ – начальная концентрация фермента и в момент времени τ соответственно. Как видно из рис. 4, точка пересечения прямых на кривой $\lg k = f(\text{pH})$ находится при pH 6.1, соответствующей pK имидазольной группы.

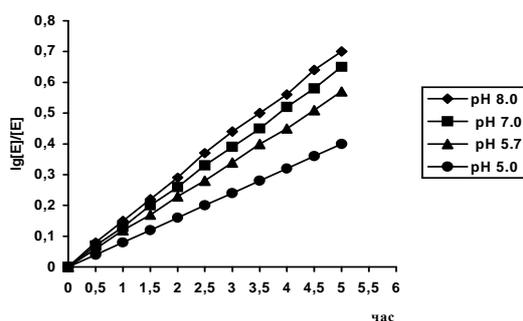


Рис. 3. Изменение $\lg[E_0]/[E]$ во времени. $[E_0]$ и $[E]$ – исходная и в данный момент времени процентная концентрации фермента соответственно, определяемые по начальной скорости реакции.

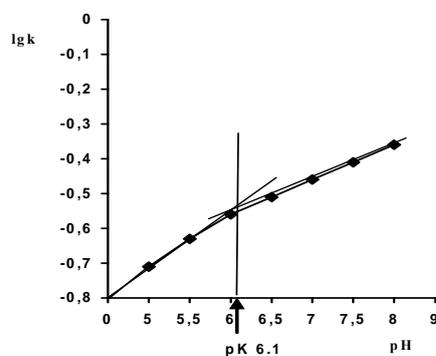


Рис. 4. Зависимость $\lg k = f(\text{pH})$ при фотоокислении ЦГТ при 40° . k – константа скорости инактивации, ч^{-1} .

Выявлено также, что с увеличением температуры pK_2 возрастает (табл.2).

С помощью этих данных из кривой зависимости pK_2 от $1/T$ была рассчитана теплота ионизации искомой группы. Она равнялась 7270 ± 200 кал/моль и соответствовала теплоте ионизации имидазольной группы гистидина.

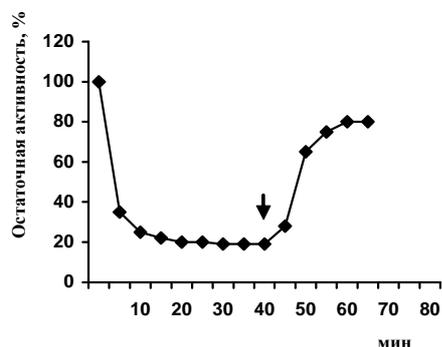


Рис. 5. Динамика инактивации ЦГТ при модификации ее с помощью ДЭПК. Стрелка указывает начало реактивации под действием гидроксиламина.

Таблица 2

Изменение pK_2 активной группы ЦГТ *Thermostreptomyces sp.* ИНМИА-А-561 в зависимости от температуры при фотоокислении

Температура, К	pK_2
293	5.4
303	5.6
313	5.7
318	5.8

3. Модификация имидазольной группы гистидина с помощью ДЭПК. Для подтверждения предположения о возможности участия имидазольной группы в каталитическом акте ЦГТ было исследовано влияние ДЭПК на активность фермента. Выявлено, что этоксикарбонилирование этой группы приводит к быстрой инактивации ЦГТ (рис. 5). Однако данный эффект может быть связан также с реакцией фенольной группы тирозина и/или ϵ -NH₂-группой лизина, а также индольного кольца триптофана и SH-группой цистеина [27]. Поэтому для точного установления причин инактивации фермента были сняты спектры поглощения модифицированного фермента при различной длине волны, так как известно, что образование карбэтоксигистидина приводит к увеличению поглощения при 242 нм, а более медленная модификация фенольного остатка тирозина – к уменьшению поглощения при 278 нм [29]. Из полученных нами результатов видно, что ДЭПК модифицирует преимущественно имидазольное кольцо гистидина, хотя имеет место также медленное окисление фенольного остатка тирозина (рис. 6).

Известно также, что если инактивация фермента обусловлена этоксикарбонилированием имидазольной группы гистидина, то с помощью деацилирования гидроксиламином можно осуществить реактивацию [27], что не наблюдается при модификации SH-группы цистеина и ϵ -NH₂-группы

лизна. В нашем случае специфичность ДЭПК к имидазольной группе подтверждается тем, что гидроксилламин реактивирует ЦГТ примерно на 80% (рис. 5). При этом следует отметить, что при модификации снижается одновременно как декстринизирующая, так и циклизирующая активность. Установлено также, что глюкоза, мальтоза, мальтотриоза и салицин являются конкурентными ингибиторами для изучаемого фермента, приводящими к уменьшению циклизирующей, но увеличивающими декстринизирующую активность. В их присутствии V_{max} реакции не меняется, однако значение K_m увеличивается с повышением их концентрации в среде. С другой стороны, в присутствии акарбозы происходит одновременное уменьшение значения как V_{max} , так и K_m (табл. 3), т.е. акарбоза является бесконкурентным ингибитором.

Таблица 3

Влияние различных ингибиторов на ЦГТ-азную активность

Защищенные гистидиловые остатки	Тип ингибирования	K_m , мг/мл крахмала	V_{max} , мг/мин крахмала	Диспропорционирование	Модификация с помощью ДЭПК		
					модифицированные гистидиловые остатки	защищен. гистидил. ост.	оста. точн. актив. ность %
Без	-	3.33	0.840	+	8	0	19.5
Глюкоза	Конкурент.	3.29	0.840	++	7.9	0	20.0
Мальтоза	Конкурент.	3.27	0.842	+++	7.8	0	22.1
Мальтотриоза	Конкурент.	3.27	0.842	+++	7.7	0	23.0
Салицин	Конкурент.	3.25	0.840	++++	8.0	0	26.7
Акарбоза	Бесконкурент.	0.31	0.105	±	6.9	1	50.2
Полимер β -ЦД	Не опр.	Не опр.	Не опр.	Не опр.	5.9	2	93.5
Акарбоза + салицин	Не опр.	Не опр.	Не опр.	Не опр.	5.9	2	95.2
Акарбоза + β -ЦД	Не опр.	Не опр.	Не опр.	Не опр.	6.0	2	92.3

Исходя из этого факта салицин, акарбоза и полимер β -ЦД были применены в качестве защитных агентов при модификации. Показано, что применение только салицина не дает никакого эффекта, в то время как полимер β -ЦД, а также акарбоза и ее смесь с салицином несколько уменьшают степень этоксиформилирования (рис. 7).

При этом если в присутствии салицина, как и без него модифицируются 8 остатков гистидина, то при акарбозе и ее смеси с салицином – 7 и 6 остатков, соответственно (рис. 8), т. е. они способны защищать 1 и 2 имидазольные группы гистидина, соответственно.

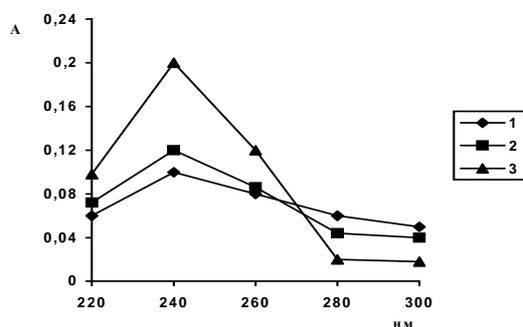


Рис. 6. Изменение спектров поглощения ЦГТ под действием ДЭПК (20.2 мкмоль ЦГТ; 2.5 мМ ДЭПК; рН 6.2; 20°): 1 – через 10 мин; 2 – 20 мин; 3 – 40 мин.

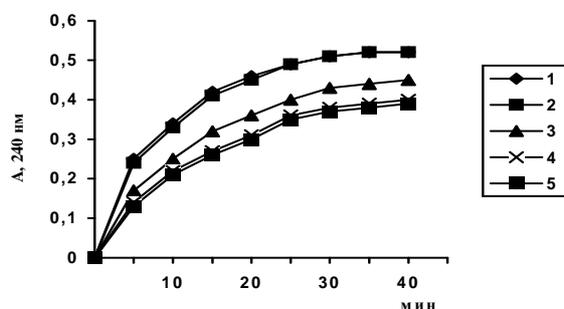


Рис. 7. Изменение оптической плотности раствора ЦГТ при 240 нм в зависимости от продолжительности действия ДЭПК (20.2 мкмоль ЦГТ; 2.5 мМ ДЭПК; рН 6.2; 30°С): 1 – только ЦГТ; 2 – ЦГТ с 5 мМ салицином; 3 – ЦГТ с 5 мМ акарбозой; 4 – ЦГТ с 5 мМ салицином и 5 мМ акарбозой; 5 – ЦГТ в сочетании с 2 мг/мл полимера β -ЦД.

Защитный эффект двух гистидильных групп достигается также при применении β -ЦД с акарбозой и полимера β -ЦД. При этом если после модификации ЦГТ сохраняет всего около 19% исходной активности, то в случае с салицином – около 27%, акарбозой – 50%, акарбоза + салицин – 95.2%, а полимер β -ЦД – 94% (рис.9), т. е. существует прямая связь между защищенными гистидиловыми остатками и остаточной активностью ЦГТ (рис. 10). При этом два гистидиловых остатка, защита которых приводит к сохранению активности, могут быть расположены в активном центре ЦГТ.

Таким образом, тот факт, что салицин, связывающийся с акцепторным центром, сам по себе не защищает гистидиловые группы при модифицировании ЦГТ с помощью ДЭПК, а в сочетании с акарбозой, которая защищает один гистидиловый остаток, защищает две такие группы, подтверждает сделанное ранее предположение о присутствии в активном центре ЦГТ донорного и акцепторного участков [1-3].

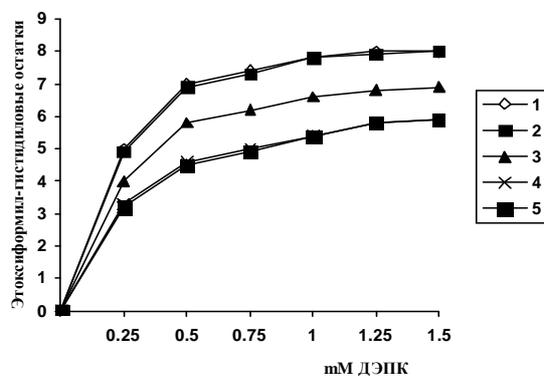


Рис. 8. Определение гистидиловых остатков в модифицированной ЦГТ через 40 мин при 30°C (условия см. на рис. 6 и в тексте): 1 – только ЦГТ; 2 – ЦГТ с 5 мМ салицином; 3 – ЦГТ с 5 мМ акарбозой; 4 – ЦГТ с 5 мМ алицином и 5 мМ акарбозой; 5 – ЦГТ в сочетании с 2 мг/мл полимером β -ЦД.

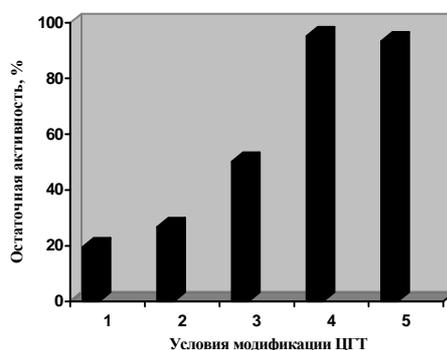


Рис. 9. Остаточная активность ЦГТ через 40 мин модификации при 30°C (условия см. на рис. 9 и в тексте): 1 – только ЦГТ (20.2 мкмоль); 2 – ЦГТ с салицином (5 мМ); 3 – ЦГТ с акарбозой (5 мМ); 4 – ЦГТ с салицином (5 мМ) и акарбозой (5 мМ); 5 – ЦГТ с полимером β -ЦД (2 мг/мл).

Согласно полученным результатам защита одного гистидилового остатка при модифицировании ЦГТ с помощью ДЭПК на 50% сохраняет исходную специфическую активность, а двух – до 95.2%. Это указывает на то, что в каталитическом акте ЦГТ важную роль играют два гистидиловых остатка, которые, видимо, локализованы в донорном подцентре. При этом каталитический акт или равномерно распределен между ними, или же только один из них участвует в каталитическом акте. В последнем случае, когда донорный подцентр не находится в акцепторно-индуцированной кон-

формации, акарбоза может взаимодействовать с ним двумя типами эквивалентной связи, но при каждом из них защищался бы только один гистидиловый остаток. В присутствии акцептора акарбоза может связываться одним-единственным, более эффективным путем, приводящим к защите обоих гистидиловых остатков в активном центре и сохраняющим полную ферментативную активность при модификации, т. е. акцепторный центр имеет предварительно связывающую функцию, приводящую к изменениям конформации всего активного центра и ориентирующую связывание донора в положении, необходимом для трансгликозилирования.

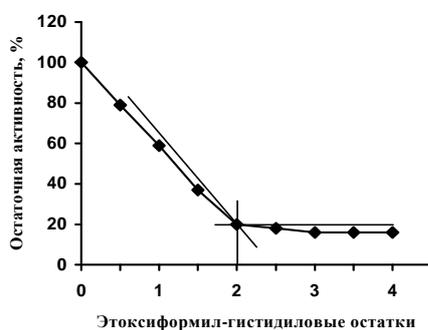


Рис. 10. Зависимость остаточной активности ЦГТ от количества этоксиформил-гистидиловых остатков. Данные пересчитаны от кривой 1 рис. 7.

Вероятно, в каталитическом центре ЦГТ карбоксильная группа выполняет роль нуклеофила, а имидазольная – электрофила, так как при оптимальном pH действия ЦГТ (pH 5.5) карбоксильная группа находится, в основном, в форме карбоксилат иона, а имидазольная – в форме протонированного имидазоля. Под действием нуклеофильно-электрофильной пары карбоксил-имидазолий происходит разрыв связи С-О с оттягиванием электронов к имидазольной группе и их уходом от карбоксила.

Авторы благодарны сотрудникам Института микробиологии А. Н. Андреасян и К. Б. Афян за активное участие в подготовке статьи.

¹ НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА, Институт микробиологии
e.mail: balayan49@yandex.com

² НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА, Центр депонирования микробов
microbio@sci.am

³ PureCircle, Малайзия

**А. М. Балаян, Л. С. Манукян, академик Э. К. Африкян,
В. А. Абемян**

**Изучение активного центра цикломальтодекстрин
глюканотрансферазы штамма *Thermotreptomyces sp.* методами
фотоокисления и модификации диэтилпирокарбонатом**

Цикломальтодекстрин глюканотрансфераза (ЦГТ, КФ 2.4.1.19), очищенная до гомогенного состояния из *Thermotreptomyces sp.*, штамм ИНМИА-А-561, была подвергнута фотоинаktivации и модифицированию диэтилпирокарбонатом в присутствии салицина, акарбозы и полимера β -циклодекстрина. Определены значения рК и теплоты ионизации групп, входящих в активный центр фермента. Установлено, что в каталитическом акте ЦГТ существенное значение имеют карбоксильная и две имидазольные группы гистидина, которые выполняют роль нуклеофильно-электрофильной пары.

**Ա. Մ. Բալայան, Լ. Ս. Մանուկյան, ակադեմիկոս Է. Կ. Աֆրիկյան,
Վ. Ա. Աբեյան**

***Thermotreptomyces sp.* շտամից մաքրված ցիկլոմալտոդեքստրին
գլյուկանոտրանսֆերազի ակտիվ կենտրոնի ուսումնասիրումը
ֆոտոօքսիդացման և դիէթիլպիրոկարբոնատի միջոցով
մոդիֆիկացման եղանակներով**

Thermotreptomyces sp. *ИНМИА-А-561* շտամից անջատված և մաքրված հոմոգեն ցիկլոմալտոդեքստրին գլյուկանոտրանսֆերազը (*ՅԳՏ, ԿՓ 2.4.1.19*) սալիցինի, ակաբոզի և β -ցիկլոդեքստրինի պոլիմերի առկայությամբ ենթարկվել է ֆոտոինակտիվացման և փոփոխության դիէթիլպիրոկարբոնատի միջոցով, ինչպես նաև որոշվել են *pK* արժեքները և իոնիզացիոն խմբերի ջերմակայունացումը, որոնք առկա են ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնում: Բացահայտվել է, որ ՅԳՏ-ի կատալիտիկ ակտի ընթացքում կարևորագույն դեր են խաղում հիստիդինի կարբօքսիլ և երկու իմիդազոլային խմբերը, որոնք հանդես են գալիս նուկլեոֆիլ-էլեկտրոֆիլ զույգով:

**A. M. Balayan, L. S. Manukyan, academician E. K. Afrikan,
V. A. Abelyan**

**Study of the active site of *Thermotreptomyces sp.* Cyclomalto-dextrin
glucanotransferase by photooxidation and modification
by diethylpyrocarbonate**

The photoinactivation and modification by diethylpyrocarbonate of the homogeneous cyclomalto-dextrin glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) produced by

Thermotremptomyces sp. INMIA-A-561 have been developed in the presence of salicin, acarbose and β -cyclodextrin (CD) polymer, as well as calculated the pK and ionization heat of the groups of active site. It was established that the carboxyl and two imidazole groups of histidine which are play the role of nucleophil-electrophil pair are very important in the catalytical action of CGTase.

Литература

1. *Абелян В. А., Ямамото Т., Африкян Э. Г.* В кн.: Биохимия. 1994. Т. 59. С. 1122-1129.
2. *Абелян В. А., Адамян М. О., Абелян Л. А.* В кн.: Биохимия. 1995. Т. 60. С. 898-904.
3. *Абелян В. А., Афан К. Б., Авакян З.Г., Мелкумян А. Г., Африкян Э. Г.* В кн.: Биохимия. 1995. Т. 60. С. 1600-1608.
4. *Bovetto L. J., Villette J. R., Fontain I. F., Sicard P. J., Bouquelet S. J-L.* - Biotechnol. Appl. Biochem. 1992. V. 15. P. 59-68.
5. *Hoschke A., Laszlo E., Hollo J.* - Carbohydr. Res. 1980. V. 81. P. 145-156.
6. *Kita Y., Sakaguchi S., Nitta Y., Watanabe* - J. Biochem. 1982, V. 92. P. 1499-1504.
7. *Dua R. D., Kochhar S.* - Mol. Cell. Biochem. 1985. V. 66. P. 13-20.
8. *Bender H.* - Carbohydr. Res. 1991. V. 209. P. 145-153.
9. *Kuriki T., Imanaka T.* - J. Gen.Microbiol. 1989. V. 135. P. 1521-1528.
10. *Matsuura Y., Kusunoki M., Harada W., Kakudo M.* - J. Biochem. 1984. V. 95. P. 697-702.
11. *Kimura K., Kataoka S., Ishii Y., Takano T., Kobayashi S.* - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989. V. 161. P. 1273-1297.
12. *Svensson B., Clarke A. J., Svensson I.* - Carlsberg Res. Commun. 1983. V. 48. P. 517-527.
13. *Svensson B., Jespersen H., Sierks M.R., MacGregor E. A.* - Biochem. J. 1989. V. 264. P. 309-311.
14. *Fujiwara S., Kakihara H., Woo K., Lejeune A., Kanemoto M., Sakaguchi K., Imanaka T.* - Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. P. 4016-4025.
15. *Ковалева Н. А., Дорожко А. И., Коган З. С.* В кн.: Биохимия. 1984. Т. 49. С. 1253-1262.
16. *Жеребцов Н. А., Корнеева О. С., Тертычная Т. Н.* В кн.: Биохимия. 1995. Т. 60. С. 1580-1588.
17. *Miles R. W.* - Methods Enzymol. 1978. Т. 47. С. 431-442.
18. *Ovadi, J., Libor, S., Elodi, P.* - Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung. 1967. V. 2. P. 455-458.
19. *Villette J.R., Sicard P. J., Bouquelet S.J-L.* - Biotechnol. Appl. Biochem. 1992. V. 15. P. 69-79.
20. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты. Т. 1. М. Мир. 1982. 234 с.
21. *Makela M. J., Korpela T. K.* - Biophys. Methods. 1988. V. 15. P. 307-318.
22. *Абелян В. А., Гаспарян А.В., Авакян З.Г., Африкян Э. Г.* В кн.: Биохимия. 1991. Т. 56. С. 1578-1582.
23. *Lejeune A., Sakaguchi K. and Imanaka T.* - Anal. Biochem. 1989. V. 181. P. 6-11.
24. *Vikmon, M.* In: Proceedings of the first international symposium on cyclodextrins (Szejtli, J., ed.), D.Reidel. Budapest. 1982. P. 69-74.

25. *Lowry O. H., Rosenbrough N. G., Farr A. L., Randell R. J.* - J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265-275.
26. *Абелян В. А., Ямамото Т., Африкян Э. Г.* В кн.: Биохимия. 1994. Т. 59. С. 778-787.
27. *Буник В. И., Гомазкова В. С.* В кн.: Биохимия. 1987. Т. 52. С. 1235-1247.
28. *Кочетов Г. А.* Тиаминовые ферменты. М. Наука. 1978. 74 с.
29. *Лосева Л.П., Бендианишвили М.В., Шатилов В. Р., Шубин В. В., Кретович В. Л.* В кн.: Биохимия. 1986. Т. 51. С. 840-849.