

УДК 577.152.34

ГЛЮКОАМІЛАЗА МІКРООРГАНІЗМІВ. БІОСИНТЕЗ, ВЛАСТИВОСТІ, МЕХАНІЗМ ДІЇ ТА ПРАКТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ

Н. В. БОРЗОВА, О. В. ГУДЗЕНКО, Л. Д. ВАРБАНЕЦЬ

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

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

В огляді наведено дані щодо систематичного положення глюकोамілаз у сучасній класифікації. Викладено сучасні погляди на регуляцію біосинтезу мікробних глюकोамілаз, висвітлено питання щодо структури та функцій окремих доменів молекули ензиму, взаємозв'язку та ролі їх у каталізі. Детально описано фізико-хімічні властивості глюкоамілаз грибного походження, показана можливість ефективної іммобілізації ензимів на різних носіях для використання їх у різних технологічних процесах.

Ключові слова: глюкоамілаза, біосинтез, будова активного центру, механізм дії, властивості ензиму, іммобілізація глюкоамілаз, практичне застосування.

Високоєфективні біокаталітичні процеси, які можуть проходити у м'яких умовах та без утворення токсичних продуктів, посідають провідне місце в сучасних технологіях, що використовуються у промисловості та сільському господарстві.

Так, технічні препарати ензимів незамінні як кормові добавки для сільськогосподарських тварин, при створенні харчових продуктів з новими властивостями і смаковими якостями, у процесі одержання екстрактних речовин, у виробництві соків і спирту, в пивоварінні тощо. Підвищений інтерес до амілолітичних ензимів зумовлений широким використанням їх як ефективних біокаталізаторів у медицині, харчовій і легкій промисловості.

За даними статистики (The worldwide directory of market research report. Studies and surveys), обсяг продажу технічних препаратів ензимів на світовому ринку в 2004 р. становив майже 1,5 млрд. дол. США, при цьому найбільш уживаними препаратами ензимів були протеази (45%) і карбогідрази (понад 35%), у тому числі целюлази, амілази та ін. Загальний обсяг продажу технічних ензимів у Росії в 2004 р. оцінювався у 50 млн. дол. США, з яких лише 1/10 частину сьогодні забезпечують російські виробники. В Україні на цей час виробляють один препарат

ензимів з глюкоамілазною активністю — «Глюколад», який є досить активним, однак кількість його дуже обмежена.

У зв'язку з вищевикладеним найбільш вагомими є роботи, спрямовані на створення промислових технологій одержання вітчизняних препаратів ензимів, що не поступаються за якістю світовим аналогам, а в багатьох випадках і кращі за них. До них належать, зокрема, ензимні комплекси глюкоамілази (ГА), що є перспективними для широкомасштабного використання у процесі оцукрювання крохмалю і мальтодекстринів [1–3]. Амілолітичні ензими, які застосовують у процесах перероблення крохмалю, становлять майже 30 % кількості всіх ензимів, що використовуються для індустриальних потреб на сучасному етапі розвитку промислових технологій [4], а загальна вартість їх — 156 млн. дол. США за рік у світовому масштабі [5,6]. ГА належить до ензимів, які найбільш інтенсивно застосовуються у світі, обсяг виробництва їх — декілька тисяч тон на рік. ГА використовують для отримання глюкози із крохмалю з подальшим виготовленням глюкозо-фруктозних сиропів, у виробництві рисових пластівців із сирого рису [7], деякі дріжджові штами застосовують в ензиматичному розшліхтовуванні накрохмаленого бавовняного

полотна в текстильній промисловості [8]. Шляхом ензиматичного синтезу за допомогою амілоглюкозидази *Rhizopus* та β -глюкозидази із солодкого мигдалю можна одержати глікозильні сполуки: N-ваніліл-нонанамід, глікозиди з D-глюкозою, D-галактозою, D-манозою, D-рибозою, мальтозою та лактозою, для подальшого використання їх у харчовій промисловості [9].

Фізіологічне значення ГА для вищих тварин полягає передусім у забезпеченні ефективного гідролізу крохмалевмісних речовин. Відомо, що нестача ГА в організмі спричинює розвиток серйозних захворювань. Так, хвороба накопичення глікогену (хвороба Помпе) — це спадкова мускульна дистрофія, причиною якої є дефіцит лізосомальної альфа-глюкозидази, що призводить до накопичення глікогену у скелетній та серцевій мускулатурі, а іноді й у нервовій тканині [10, 11]. У цьому разі ензимна замісна терапія на ранніх стадіях може бути дуже ефективною [12].

Зважаючи на значний практичний інтерес до ГА метою нашого огляду є висвітлення сучасних уявлень щодо систематичного положення цього ензиму, окреслення можливих шляхів керування його біосинтезом у мікробних продуцентах для подальшого практичного використання, а також узагальнення наявних даних щодо взаємозв'язку між структурою молекули та механізмом дії ензиму.

Класифікація

ГА (α -1,4-глюкан глюкогідролаза, КФ 3.2.1.3.), відома також як екзо-1,4- α -глюкозидаза або γ -амілаза, амілоглюкозидаза, лізосомальна α -глюкозидаза, кисла мальтаза, матулаза, розщеплює сирий та розчинний крохмаль з утворенням переважно глюкози і невеликої кількості декстринів. ГА каталізує послідовне відщеплення α -1,4-зв'язаних кінцевих залишків D-глюкози з нередукуючих кінців субстрату, що супроводжується інверсією аномерної конфігурації і утворенням β -глюкози. Більшість глюкоамілаз мають здатність також гідролізувати α -1,6-глікозидні зв'язки, проте з меншою швидкістю, ніж α -1,4-зв'язок [13]. Специфічна активність (k_{cat}/K_m) ГА щодо α -1,6-зв'язку становить 0,2% від активності щодо α -1,4-зв'язку [14, 15]. Однак це відбувається лише в тому разі, коли за α -1,6-зв'язком іде α -1,4-зв'язок, тому декстрини ними не гідролізуються. Характерною особливістю ГА є здатність у десятки разів швидше гідролізувати високополімеризований субстрат, ніж оліго- та дисахариди [16].

Збільшення виходу глюкози у процесах цукрофікації за межу 96% може бути досягнуто саме за рахунок гідролізу ГА α -1,6-зв'язків, присутніх у крохмалевмісній сировині [17].

ГА входять до 15-ї родини глікозидгідролаз і на цей час виявлено 23 первинні структури ГА нитчастих грибів, дріжджів, еубактерій та архей. Встановлено тривимірну структуру каталітичного домену ГА *Aspergillus awamori* var. X100 як для нативного протеїну, так і для його лігандзв'язаних форм [18–20]. Також було визначено структури дикого типу та мутантів *A. niger* [21], які показали на 94% подібність послідовності амінокислот у порівнянні з *A. awamori* var. X100. Крім того, є повідомлення про подібність до них і крохмальзв'язувальною домену дріжджової ГА *Saccharomycopsis fibuligera* [22].

Продуценти ГА

ГА — широко розповсюджений у природі ензим, він присутній як в організмі вищих тварин, так і серед мікроорганізмів різних таксономічних груп. Але безперечно найбільш дослідженою і найчисленнішою групою є грибні продуценти ГА. Багато видів мікроміцетів здатні до продукування ГА у різноманітних ензиматичних умовах і виробництвах. Практичну цінність мають продуценти, ГА яких гідролізують сирий крохмаль при підвищених температурах. Такі термостабільні ГА характерні для *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *Mucor rouxians*, *M. javanicus*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus delmar*, *R. oryzae*, *R. fonkinensis*, *R. neveus*, *R. tonnenensis*, *R. japonicum*, *R. javanicus*, *R. topnineseus* [13] та *Arthrotrichum amerospora* [23, 24]. Проте увагу дослідників сфокусовано передусім на *A. niger* та *R. oryzae*. Використання ГА із цих джерел у крохмальдеградуючих виробництвах пояснюється їх досить високою термостабільністю та активністю за нейтральних значень рН [25, 26].

Для комерційного виробництва ГА використовують представників *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Endomyces*. Усі три типи ГА здатні до повного гідролізу крохмалю до глюкози. Ензими із *Rhizopus* і *Endomyces* менш термостабільні, ніж ензими з *Aspergillus*. Оптимальна температура гідролізу крохмалю для ГА *Aspergillus* — 60 °С, а для інших двох 55 °С, рН 4,2–4,5. Ця різниця має важливе значення, оскільки при температурах нижче 60 °С важко запобігти мікробному зараженню у процесі гідролізу. Тому ГА

Aspergillus, в основному штамам *A. niger*, віддають перевагу перед ензимами з *Rhizopus* і *Endomyces*.

Активні продуценти ГА виявлено серед грибних штамів *Coniophora cerebella*, *M. rouxianus*, *Cephalosporium charticola* Lindow, *Penicillium oxalicum*. Продуцентами ГА є і культури дріжджів — *Endomyces*, *Saccharomyces diostaticus*, *Candida pelliculosa* [27].

У процесі культивування продуцентів утворюється низка супутніх ензимів: протеази, целюлази, β -галактозидази, α -амілази і трансглюкозидази. Присутність трансглюкозидази у препаратах ГА, що використовуються для гідролізу крохмалю, є небажаною. Трансглюкозидаза каталізує утворення ізомальтози та олігосахаридів із глюкози, знижуючи тим самим вихід глюкози під час оцукрювання крохмалю. Також було знайдено іншу трансферазу, що каталізує утворення α -1,3-зв'язаних олігосахаридів із мальтози [28]. Уникнути присутності небажаних ензимів дозволяє використання мутантів, які продукують ці ензими в незначних кількостях. Цінним штамом, який продукує дуже малу кількість трансглюкозидази, є *A. awamori* NRRL 3112 [29]. Для більшості штамів — продуцентів ГА видалення трансглюкозидази є серйозною проблемою. Розроблено ряд методів очищення, але багато з них пов'язані зі втратою глюкоамілазної активності. Майже всі без винятку препарати ГА надходять у продаж у рідкій формі. Завдяки низькому значенню рН (близько 4,5) і високій концентрації сухої речовини, а також присутності спирту й органічних кислот забезпечується висока стабільність препаратів. Спирти справляють стабілізуючий вплив на активність препарату під час його зберігання [13].

Біосинтез ензимів

ГА одержують глибинною, твердофазною або напіврідкою ферментацією, застосовуючи качалкові колби, барбатуєчі реактори або ростові камери з кюветами. Продуктування ГА залежить як від вибору біореактора, так і від умов вирощування. Як біореактори для вивчення умов біосинтезу ГА можуть бути використані колби, кювети, ротаційні реактори, колонкові біореактори (вертикальні або горизонтальні) [30]. Ж. Во зі співавт. [31] вивчали умови продуктування ензиму культурою *R. oligosporus* в умовах барбатуєчого реактора. Досліджено продуктування ГА рекомбінантним штамом *A. niger* в умовах хемостату з лімітом глюкози та додаванням

різних джерел органічного азоту [32]. Було показано, що додавання у середовище культивування різних органічних джерел азоту, в тому числі аланіну, метіоніну, казамінових кислот або пептону, призводить до зниження специфічної активності ГА.

46 штамів *Rhizopus* з різних джерел було перевірено за здатністю росту і активністю біосинтезу ГА як на твердому середовищі з нативним крохмалем і пшеничними висівками, так і в рідкому середовищі, в якому змінювалась концентрація іонів Ca^{2+} і Zn^{2+} [33]. Максимальне накопичення біомаси та максимальний вихід ензиму спостерігали у штаму *Rhizopus* sp. A-11 у зануреній культурі за вмісту цинку $7 \cdot 10^{-5}\%$. Подальше збільшення вмісту цинку супроводжувалося пригніченням росту міцелію. У дослідженнях, які проводили зі штамом A-11, показано, що в рідкому живильному середовищі загальна активність ГА вища в 4,4 раза, а питома активність ГА щодо нативного крохмалю — у 3 рази порівняно з відповідними показниками під час твердофазного культивування, тимчасом як для кислоти і нейтральної протеаз спостерігається зворотна залежність, а рівень α -амілази однаковий у культурах обох типів.

Вивчено здатність двох штамів *R. oryzae* (MUCL 28627 і MUCL 28168) і одного штаму *R. delemar* (ATCC 34612) продукувати глюкоамілазу, яка діє на гранульований крохмаль. Як субстрат для твердофазної ферментації використовували багасу (жом) рослини касави (*Manihoc esculenta*, Crantz) [34].

Було досліджено вплив джерел вуглецю й азоту на утворення ГА *A. niger*, що бере участь у розщепленні неочищеного крохмалю. Утворення ензиму змінювалось залежно від джерел вуглецю. Рівень ГА був мінімальним навіть за низьких концентрацій глюкози, натомість інші вуглеводи стимулювали її утворення. Пшеничні висівки і целюлоза, а також дещо меншою мірою рисові висівки були найефективнішими індукторами активності ГА. Екзогенна глюкоза пригнічувала синтез ензиму в культурах *A. niger*, що ростуть на пшеничних висівках. У *A. niger* синтез ГА значно активізували мальтоза, целодекстрин, целюлоза або целюлозо-і геміцелюлозовмісні субстрати. У період росту *A. niger* на пшеничних висівках максимальна продуктивність ГА становила 274 МЕ/л/год, тобто значно перевищувала величини, про які повідомляли дослідники для деяких інших грибів. Додавання актиноміцину Д (репресор транскрипції) і циклогексиміду (репресор трансляції) повністю

пригнічувало біосинтез ГА, що у свою чергу вказує на те, що регуляція синтезу ГА у цьому організмі відбувається і на транскрипційному, і на трансляційному рівні. Термодинамічні дослідження показали, що культура «захищається» від термальної інактивзації за дії різних температур у період ферментації [35].

Безпосереднього ефективного синтезу етанолу у процесі ферментації сирого кукурудзяного крохмалю було досягнуто з використанням рекомбінантних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. На поверхні клітин дріжджів відбувається накопичення ГА *R. oryzae* і α -амілази *Streptococcus bovis* за рахунок якірних протеїнів С-кінцевої половини α -аглютиніну і функціонального домену флокуляції протеїну Flo 1 р відповідно. У разі 72-годинної ферментації штаму синтезував 61,8 г/л етанолу, що становить 86,5% від теоретичного виходу за крохмалем [36].

Для підсиленого продукування ГА проводили твердофазне культивування *Fusarium solani*, використовуючи різні субстрати, у тому числі пшеничні, рисові, кукурудзяні висівки, а також висівки зеленого та чорного гороху. Найбільшу ензиматичну активність спостерігали у випадку використання пшеничних висівок. Максимальної ензиматичної активності ($61,35 \pm 3,69$ Од/г сухих пшеничних висівок) було досягнуто за оптимізованих умов росту *F. solani*, а саме: фруктоза (1%) — джерело вуглецю й енергії, сечовина (1%) — джерело азоту, вихідна вологість твердого субстрату — 70%, період інкубації — 96 год, об'єм інокуляту — 15% (10^6 – 10^7 спор/мл), температура інкубації 35 ± 1 °С, рН 5,0. Показано, що додавання поверхнево-активних речовин зумовлює послаблення біосинтезу ензимів у *F. solani* під час твердофазної ферментації [37].

Було проведено порівняння ефективності використання крохмалів сорго, картоплі, кукурудзи і касави, а також мальтози для одночасного культивування і продукування позаклітинних α -амілази і ГА новим ізолятом *Trichoderma* sp. Встановлено, що мальтоза є кращим субстратом для активності та продуктивності α -амілази (~2800 Од/л та ~390 Од/л·год відповідно), а крохмаль касави і кукурудзи забезпечує вищу активність ГА (17000–18000 Од/л) за показників продуктивності, близьких до таких, як у разі використання мальтози (~100 Од/л·год). У зв'язку з тим, що штам *Trichoderma* sp. здатен продукувати або α -амілазу, або глюкоамілазу, доцільно використовувати його

у прямих процесах оцукрювання сирого крохмалю без попередньої желатинізації [38].

Вивчення впливу джерел азоту на продукування позаклітинних амیلотичних ензимів *Trichoderma* sp. показало, що із застосуванням суміші сечовини і сульфату амонію культура була здатна ефективно деградувати нежелатинований розчинний крохмаль з утворенням α -амілази і ГА. Досліджуючи різні джерела азоту, в тому числі цитрат амонію, дріжджовий екстракт, сечовину, сульфат амонію, суміш сульфату амонію і сечовини, пептон і кукурудзяний екстракт, з'ясували, що кукурудзяний екстракт був найкращим джерелом азоту для активності й продуктивності як α -амілази, так і ГА [39].

Було встановлено оптимальні умови для глибокого культивування екстремального термофільного гриба *Thermomucor indicaseudaticae*: сахароза — 2%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,13%; дріжджовий екстракт — 0,1%; об'єм інокулюма — $5 \cdot 10^6$ спор у 50 мл середовища; час інкубації 48 год, температура 40 °С, рН 7,0, що дозволяє досягти глюкоамілазної активності на рівні 34,2 Од/мл [40]. Також для цього продуцента було показано, що цукрово-дріжджовий бульйон з успіхом може бути замінений на очеретяну мелясу (7%) та нітрат амонію (0,25%) [41].

Такої самої думки щодо суворості залежності синтезу ГА грибного походження від природи та співвідношення джерел азоту і вуглецю дотримується більшість авторів. Так, для *A. awamori* спостерігалось 100% зростання активності із заміною сечовини на сульфат амонію, співвідношення С/Н було 4,8, як додаткове джерело вуглецю використовували мальтозу. Співвідношення С/Р у діапазоні 5,1–28,7 не впливало на продукування ГА за цих умов [42].

Також є результати, що свідчать про можливість збільшення виходу ГА у разі використання під час культивування синього світла [43].

Характеристика мікробних ГА

Найповніше на цей час досліджено властивості грибних ГА, оскільки саме ензими із цих джерел використовують у промисловості. ГА грибного походження зазвичай мають множинні форми [27]. Але ця множинність найімовірніше виникає внаслідок дії протеаз, які синтезуються одночасно з ГА, або, як зазначає Svensson зі співавторами [44], утворюються внаслідок різних вторинних процесів. Було доведено [45], що ГА *A. awamori* синтезується як одна форма —

основна ГА. У результаті обмеженого протеолізу цієї форми, що відбувається у культуральній рідині, утворюються гомогенні мінорні форми через відщеплення пептиду, який містить додатковий субстратзв'язувальний центр. ГА складається з двох доменів — каталітичного та крохмальзв'язувального, які зв'язані О-глікозильованим поліпептидним ланцюгом, розташованим з N-кінця (рис. 1). Крохмальзв'язувальний домен відіграє головну роль у гідролізі крохмалю та забезпечує адсорбцію ензиму до клітинної стінки, місцево збільшуючи концентрацію ензиму, що зумовлює зростання виходу глюкози в середовище [46, 47]. Часткове або повне видалення крохмальзв'язувального домену протеолітичним обробленням призводить до утворення ГА, здатної до гідролізу виключно розчинного крохмалю [48]. Тому цілком очевидно, що позбавлення від протеаз у процесі ферментації дозволяє одержувати ГА, що здатні до гідролізу сирого крохмалю. Це завдання може бути успішно вирішено: а) іммобілізацією клітин [49]; б) відбором морфологічних форм [50]; в) контролем рН [42]; г) варіюванням живильного середовища [51]; д) будовою біореактора [30]; е) використанням інгібіторів протеаз [52].

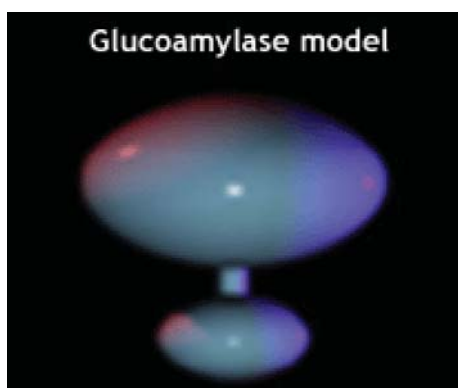


Рис. 1. Модель ГА

[<http://www.ifr.ac.uk/spm/aboutus.html>]

Молекулярна маса та структура ГА. Молекулярна маса ГА грибного походження зазвичай лежить у діапазоні від 48 до 90 кДа (табл.), винятком є ензим з *A. niger*, який має масу 125 кДа [59]. Вуглеводний компонент становить близько 10–20% від молекулярної маси. Наприклад, вуглеводний фрагмент ГА С та *D. niveus* дорівнює 14,9% та 12,7% відповідно [60], тоді як у *N. crassa* — лише 5,1% [61]. Для двох форм ГА, які виділено з культуральної рідини *Monascus purpureus*, встановлено [56], що вуглеводні компоненти становили 15,0% та 16,2%.

Полісахаридний залишок не впливає на третинну структуру молекули ензиму, однак його усунення знижує секрецію ГА з клітини та зменшує термостабільність. Низька щільність глікозильованих залишків біля каталітичного домену може бути причиною його жорсткості. До того ж вуглеводні фрагменти беруть участь у зв'язуванні молекул субстрату та його аналогів і локалізації молекул води, які визначають взаємодію поодиноких ланок вуглеводу між собою та сприяють збільшенню стабільності ензиму. Показано, що вуглеводний компонент запобігає розгортанню та частково агрегації протеїнів. Також важливу роль відіграє цей компонент у захисті ГА від протеолізу. З'ясовано, що малоглікозильовані ГА більше піддаються впливу протеаз [62].

Експериментальним шляхом було досліджено вплив різних фізико-хімічних факторів на конформацію макромолекули ГА із *A. awamori* та зв'язаних з нею механізмів активації й інактивації цього ензиму; вивчено кінетико-термодинамічні аспекти реакції гідролізу крохмалю [63–65].

Методом гель-хроматографії визначили молекулярну масу ГА — 106 кДа. Дослідження амінокислотного складу показало, що молекула ГА містить 26,8% амінокислотних залишків з алкільними боковими ланцюгами (Ala, Val, Leu, Met, Ile), що визначають високий вміст у молекулі ГА Ser і Thr. Результати експериментів і аналіз даних літератури стосовно секвенування ГА [20] дозволяють зробити висновок про те, що молекула ензиму має 6 SH-груп і 4 дисульфідних зв'язки, що стабілізують його третинну структуру. Вивчення надмолекулярного рівня організації ГА показало наявність четвертинної структури, представлені двома ідентичними субодиницями з молекулярною масою 53,6 кДа, що відповідають за каталітичну активність. Її стабільність визначається водневими зв'язками і гідрофобною взаємодією і може залежати від незначних змін у просторовій структурі кожної із субодиниць, які взаємодіють [45].

Результати дослідження впливу *n*-меркурібензоату на каталітичну активність ГА дозволяють зробити висновок про те, що до складу активного центру такого ензиму не входить імідазольна група гістидину, а також SH-групи, а в гідролізі крохмалю беруть участь карбоксильні групи аспарагінової і глютамінової кислот (групи Asp-55, Glu-179, Glu-400 (рис. 1).

Активний центр ензиму міститься у щілині, прикритій двома кластерами молекул

Деякі фізико-хімічні властивості грибних ГА

Продуцент	Термо-оптимум	Термостабільність	pH-оптимум	pH-стабільність	Mr	Специфічність
<i>Thermoplasma acidophilum</i> [53]	75 °С	40–90 °С 5 mM CaCl ₂ стабілізує	5,0	pH 3,5–7,0	66 кДа	Глікоген, амілоза, амілопектин
<i>Chaetomium thermophilum</i> [54]	65 °С	60 °С, 80% активності 60 хв при 70 °С. 50% активності 40 і 10 хв при 80 та 90 °С	4,5–5,0	pH 4,0–7,0	66 кДа	Крохмаль, глікоген
<i>Paecilomyces variotii</i> [55]	55 °С	60 хв при 50 та 55 °С, 45 хв при 60 °С (у присутності субстрату)	5,0	pH 3,0–7,5	86,5 кДа	Амілопектин, глікоген та крохмаль, менше мальтоолігосахариди та амілоза
<i>Monascus purpureus</i> (дві форми) [56]	50 та 65 °С	50–60 °С	5,0	pH 3,0–7,5	60 та 89 кДа	Крохмаль
<i>Curvularia lunata</i> [57]	50 °С	60 хв при 55 °С	4,0	3,0–6,0	66 кДа	Крохмаль, рамнозильні залишки у стероїдних сапонінах
<i>Thermomyces lanuginosus</i> [58]	70 °С	60 хв при 80 °С	5,0	4,0–6,0	66 кДа	Км 3,5 мМ для розчинного крохмалю

H₂O: перший — у ділянці Leu-58 (12 молекул H₂O), другий — у заглибленні активного центру (7 молекул). Встановлено, що з одного боку щілини активного центру сконцентровані Asp-55 і Glu-179, а з протилежного — Glu-400 та Trp-120 (рис. 2) [19].



Рис. 2. Просторова структура макромолекули ГА

A. awamori [19]. Активний центр:

А) 1 — Leu-58; 2 — Leu-130; 3 — Leu-177; 4 — Leu-319; 5 — Trp-178; 6 — Trp-417; 7 — Phe-187.

Б) 1 — Asp-55; 2 — Glu-179; 3 — Glu-400

Результати рентгеноструктурного аналізу [18, 20] показали, що поверхня молекули ГА глікозильована: до 10 амінокислотних залишків серину і треоніну приєднана маноza (Ser-453, Ser-455, Ser-459, Thr-457 та ін).

Цей ензим характеризується наявністю N-термінального каталітичного домену, який складається із 440 амінокислотних залишків, O-глікозильованої ділянки, яка має 70 амінокислот, і C-термінального крохмальзв'язувального домену (100 амінокислот). Каталітичний домен має 2 N-глікозильні ділянки, причому контакт між N-глікозильними ланцюгами і поліпептидом стабілізується залишком манози за допомогою водневого зв'язку або іонізованими молекулами води, чим і визначається стабільність ензиму і можливість утворення надмолекулярних структур. O-глікозильований домен має залишки Glu перед і після C-кінця, які являють собою вигини, що визначають взаємодію крохмальзв'язувального домену з каталітичним, та відповідну орієнтацію молекули субстрату. Глікозилювання запобігає скупченню молекул субстрату в зв'язувальних центрах і забезпечує стехіометричне зв'язування. Крохмальзв'язувальний домен визначає зв'язування розчинних ліганд (β-циклодекстринів).

Методом комп'ютерного моделювання встановлено, що для молекул ГА є характерним щільне упакування гідрофобного ядра у вигляді 13 α-спіральної ділянок (рис. 3), а також антипаралельних β-структур, що утворюють 11 петель (рис. 4).

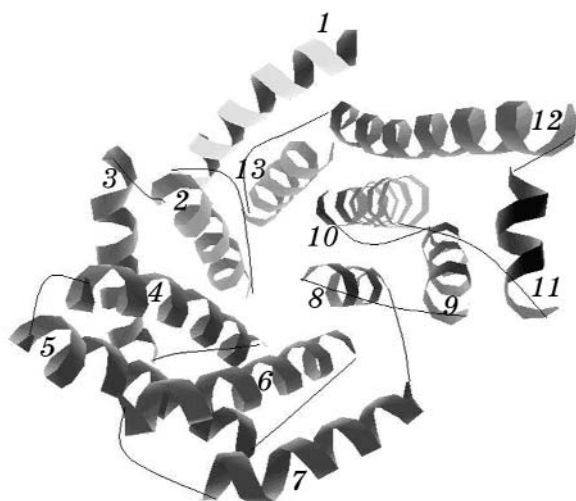


Рис. 3. Топологія α -спіралей у макромолекулі ГА [19]

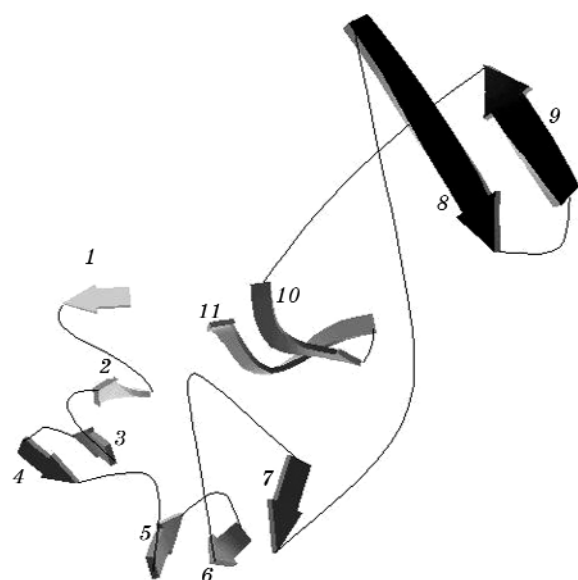


Рис. 4. Топологія β -шарів у макромолекулі ГА [19]

У вторинній структурі присутні, окрім цього, 19 неупорядкованих ділянок (рис. 5). У відсотковому співвідношенні таких структур за довжиною переважають аморфні ділянки, що підтверджено методом ІЧ-спектроскопії.

Зараз тривають роботи щодо вивчення топології різних амілолітичних ензимів, обговорюються питання топологічної самоорганізації досліджених протеїнових макромолекул, яка визначається взаємозв'язком первинної та вторинної структур [17].

Режим оптимального функціонування. Грибні ГА активніші за кислих значень рН, однак для різних ензимів відзначаються різні рН-оптимиуми (табл.). Наприклад, одна з трьох ГА *Arthrobotrys amerospora* мала

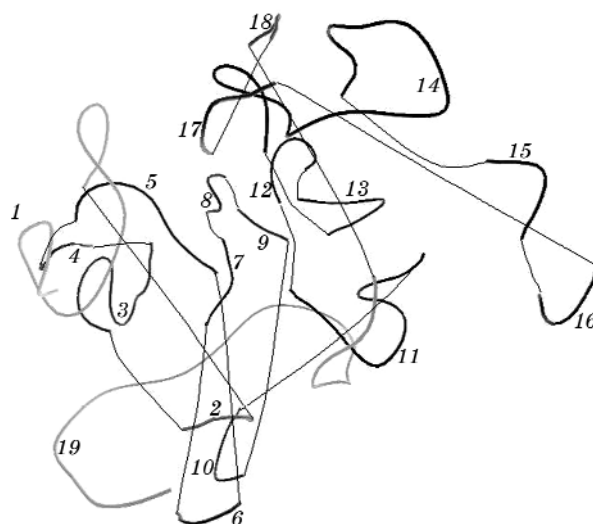


Рис. 5. Топологія неупорядкованих ділянок у макромолекулі ГА [19]

рН-оптимиум 6,0, а дві інші — 5,6 [66]. Комерційний препарат ГА з *A. niger* складається з шести різних форм, рН-оптимиум яких — у межах від 3,5 до 5,0 [67]. Spinelli зі співавт. [61] показали, що ГА, одержана з мутантного штаму *N. crassa*, виявляла максимальну активність за рН 5,4, а ГА зі *Monascus kaofiang* nov-sp. F-1 мала дві активні форми з рН-оптимиумами 4,5 та 4,7. Стабільність ГА також залежить від концентрації водневих іонів, але зазвичай вони цілком стабільні у діапазоні рН від 3,0 до 7,0.

Температурні оптимиуми дії ГА в основному перебувають у межах 50 — 60 °С. Ензими з *A. niger* NRRL 330 та *A. awamori* var. *kawachi* були найбільш активні при 50 °С та 60 °С відповідно, а з *A. amerospora* — при 55 °С [61, 66, 68]. Однак для деяких грибів встановлено вищі значення термооптимиумів, зокрема у ГА з *T. reesei* та *Scytalidium thermophilum* 70 °С [69, 70]. У багатьох грибних ГА термостабільність спостерігається за високих значень, але протягом нетривалого часу [71].

Механізм дії ГА

ГА — екзоензим кінцевої дії, що розщеплює у крохмалі як α -1,4, так і α -1,6-зв'язки. Послідовно відщеплюючи від нередукуючих кінців ланцюгів один глікозидний залишок за іншим, ГА уможливорює практично повний гідроліз полі- і олігосахаридів до β -глюкози. Повнота і швидкість гідролізу в різних ГА відрізняються.

Суттєва різниця гідролізу полі- і олігосахаридів ендамілазами порівняно з гідролізом

екзоамілазами полягає в тому, що в першому випадку гідроліз відбувається зі збереженням конфігурації продуктів реакції і супроводжується трансглікозилюванням, а в другому — з обертанням конфігурації, окрім того, ензими цього типу не мають трансглікозилювальної активності. Трансглікозилювання, тобто негідролітичне перетворення олігосахаридів, є характерною особливістю ендоамілаз і проходить паралельно або слідом за гідролітичною реакцією.

Вивчення механізму дії амілолітичних ензимів супроводжується певними складнощами, передусім вони полягають у тому, що субстрат — крохмаль — неоднорідний і має різні характеристики за ступенем полімеризації глікозидного ланцюга та кількості розгалужень.

Субстратами для дії амілолітичних ензимів є крохмаль — рослинний полісахарид, який складається з 13–30% амілози і 70–85% амілопектину, продуктів часткового гідролізу крохмалю та глікогену. Обидва компоненти неоднорідні, їхня молекулярна маса лежить у широких межах і залежить від природи крохмалю. Амілоза — це нерозгалужений полімер, у якому залишки глюкози з'єднані α -1,4-глікозидним зв'язком, зі ступенем полімеризації близько 2 000, молекулярною масою від 50 000 до 160 000. В «аномальних» амілозах з одним-двома α -1,6-зв'язками полімеризація може зрости до 6 000. Амілоза практично не має відновлювальної здатності, оскільки в кожній молекулі амілози є лише одна вільна альдегідна група.

Молекула амілози має вигляд розтягнутої спіралі, крок якої становить 10,6 А, і в кожний виток входить 3 залишки глюкози. Максимальна довжина молекули амілози досягає 7 000 А. У розчині спіраль стискається за рахунок збільшення витка, в якому беруть участь вже 6 залишків глюкози. Зі входженням молекул йоду в спіраль амілози виникає характерне синє забарвлення. Точно говорити про величину молекули амілози не можна, оскільки навіть із одного зразка крохмалю виділяється амілоза з величиною молекули від 500 до 2 000 залишків глюкози.

Амілопектин має більшу молекулярну масу (до 1 000 000), ніж амілоза, і складнішу будову. Це полісахарид, який складається з розгалужених ланцюгів молекул глюкози, що зв'язані як між 1-м та 4-м, так і між 1-м та 6-м вуглецевими атомами.

Існує дві гіпотези щодо механізму дії екзоамілаз на субстрат. Перша гіпотеза при-

пускає, що, діючи на субстрат за одноланцюговим або «блискавичним» механізмом, екзоамілаза утворює ензимсубстратний комплекс із захопленням передуючого кінця ланцюга. Подальший рух ензиму по цьому ланцюгу відбувається до повного його гідролізу. За другою гіпотезою ГА діє на субстрат шляхом множинної атаки, тобто ензим утворює комплекс з молекулою субстрату, потім через декілька етапів цей комплекс розпадається і ензим зв'язується з новою молекулою субстрату. Іншими словами, у разі множинної атаки відбувається дещо середнє між неупорядкованим механізмом і одноланцюговою, «блискавичною» атакою. Для повного гідролізу за даним механізмом одна молекула субстрату має утворювати багато різних ензимсубстратних комплексів. При цьому можливий гідроліз декількох зв'язків в одному каталітичному акті.

Механізм дії амілолітичних ензимів на субстрат може бути розглянутий з декількох позицій:

1. Вид зв'язку, що розривається (α -1,4 або α -1,6).
2. Тип дії на субстрат (ендо- або екзо-).
3. Вплив на швидкість гідролізу ступеня полімеризації субстрату.
4. Можливість гідролізу олігосахаридів.

Наявність ознак амілаз, відображених у 3-й і 4-й позиціях, за дії на лінійні субстрати може свідчити про існування в цих ензимах підцентрової структури. Ймовірно, активний центр амілази може складатися із декількох підцентрів, кожен з яких може вступати в контакти із глюкозним залишком. Вільна енергія взаємодії (ΔG , кДж/моль) визначає підцентрову подібність ензиму до субстрату. Ця подібність індивідуальна і може бути як «позитивною», так і «негативною». Імовірність існування підцентрових структур амілолітичних ензимів допомагає встановити будову активного центру, дає більш чітке пояснення субстратної специфічності, але не пояснює механізм гідролізу розгалужених субстратів. На основі кінетичних досліджень ГА *A. saitoi*, *A. oryzae*, *A. niger* та *Arthrobotrys amerospora* встановлено, що в молекулі ГА є 7 підцентрів зв'язування субстрату [66, 72–75]. Глікозильне зв'язування мальтоолігомерів відбувається між підцентрами 1 та 2. Різні підцентри мають різну спорідненість до субстрату. Афіність першого підцентру дуже низька, а другий підцентр має найвищу спорідненість до субстрату, спорідненість інших підцентрів зменшується від третього до сьомого. Ключову роль у стабілізації

центрів зв'язування відіграє Trp-120 [75]. Взаємодія з підцентрами 1 та 2 сприяє зміні конформації ензиму.

Здатність глобулярних протеїнів утворювати якісні монокристали, в яких всі атоми ідентичні й орієнтовані однаковим чином, дозволила вивчати їх за допомогою методу кристалографії. Відомо, що дані рентгеноструктурного аналізу завжди правильно відображають укладку протеїнового ланцюга, а в переважній більшості випадків буквально відтворюють активну конформацію ензиму. Відповідно, вони є надійною і поки що єдиною основою для кількісного опису механізму каталітичного акту на атомно-молекулярному рівні. Метод кристалографії дозволяє розшифрувати тривимірні структури комплексів ензимів з інгібіторами, які тією чи іншою мірою відповідають хімічним стадіям каталізу. Наявність рентгеноструктурних даних, одна частина яких відповідає реальному вихідному стану ензиму, а інша — ензимінгібіторним комплексам, уможливило відтворення механізму каталітичного акту і, відповідно, дає змогу простежити за динамікою поведінки протеїнової макромолекули [76].

На цей час існує таке припущення щодо механізму розриву α -1,4-глікозидного зв'язку у молекулі крохмалю під дією ГА [45]. З утворенням ензимсубстратного комплексу за участю Trp-120 та O-глікозильованих ділянок крохмальзов'язувального домену відбувається іонізація Asp-55 та Glu-179, причому акцептором протонів є OH-група нередукуючого кінця молекули крохмалю. Можливо, що Glu-179 протонувана вже на початку реакції.

Фізико-хімічні параметри мікрооточення активного центру сприяють зменшенню pK_a цього амінокислотного залишку, причому молекула ензиму не піддається структурним змінам. Протонування зумовлює збурювальну дію на електронну конфігурацію α -1,4-зв'язку та спричиняє утворення термодинамічно більш вигідної конформації «напівкрісла».

Ензимсубстратні комплекси можуть бути продуктивними та непродуктивними, і в першому випадку молекула субстрату займає перший підцентр, а зв'язок, що розщеплюється, розташовується між каталітичними групами активного центру. Гідрофобні амінокислотні залишки сприяють більш жорсткій фіксації субстрату.

Визначення активності ГА

Глюкоамілазна активність (ГлАк) характеризує здатність ензимних матеріалів каталізувати розщеплення розчинного крох-

малю до глюкози і виражається числом одиниць активності в 1 г досліджуваного твердого матеріалу або в 100 мл (чи в 1 мл) рідкого продукту. Глюкозу визначають шляхом окиснення її киснем повітря в глюконову кислоту за допомогою глюкозооксидази. Продукти реакції визначають колориметричними методами.

Активність глюкоамілазних ензимів визначається в очищених і технічних препаратах, у культурах, одержаних з використанням продуцентів мікробного походження.

Визначення ГлАк у зразках крові проводять при рН 3,8–4,0 за допомогою 2 мМ синтетичного субстрату 4-метилумбеліферил- α -глюкозиду або глікогену (50 мг/мл) у присутності акарбози (39 мМ), яку використовують для інактивації ізоферменту мальтози — глюкоамілази [77].

Практичне застосування іммобілізованих ГА

У другій половині ХХ ст. почали широко використовувати здатність до зв'язування окремих ензимів певними речовинами-носіями, що їх застосовували з метою очищення цих ензимів, для створення іммобілізованих ензиматичних систем. Іммобілізовані ензими відзначаються низкою переваг перед вільнорозчинними формами. По-перше, їх можна багаторазово використовувати, що значно здешевлює ензиматичні процеси в промислових технологіях і підвищує якість контролю за ензиматичними циклами. По-друге, іммобілізація вибірково молекул ензимів на підібраних носіях дає змогу очищувати ензими [78]. По-третє, під час іммобілізації утворюються просторові конформації ензиму і субстрату, які забезпечують кращий контакт між ними. По-четверте, беззаперечною перевагою використання іммобілізованих ензимів для індустріального використання є можливість іммобілізації кількох амілолітичних ензимів на одному носії. І, врешті-решт, іммобілізація стабілізує структуру ензимів [79]. Відомо, що термостабільність ГА, іммобілізованої на пористому склі, збільшується в 15 разів (при 75 °С) у присутності субстрату (мальтоза, декстрини) [80]. Іммобілізація ензимів у присутності субстрату забезпечує його високу ензиматичну активність завдяки правильній орієнтації молекули ензиму на поверхні носія.

На основі ГА і вуглецевмісних носіїв одержано гетерогенні біокаталізатори процесу оцукрювання крохмалю і досліджено

їхні біокаталітичні властивості в реакції ензиматичного гідролізу кукурудзяних декстринів. Показано, що морфологія поверхневого вуглецевого шару носіїв справляє суттєвий вплив на властивості одержаних біокаталізаторів. ГА, іммобілізована адсорбцією на поверхні носіїв із шаром каталітичного волокнистого або піролітичного вуглецю, виявляла максимальну ензиматичну активність і стабільність, тимчасом як біокаталізатори, виготовлені на основі носіїв без вуглецевого шару або з графітоподібним поверхневим вуглецем, відзначались низькою активністю і стабільністю [81].

Базуючись на експериментальних даних із дослідження властивостей отриманих біокаталізаторів вуглецевмісних носіїв з оптимальною морфологією вуглецю, можна вибудувати такий ряд: керамзит/КВВ (каталітичний волокнистий вуглець) (20 Е/г) > піноскло/КВВ (60 Е/г) ≈ сапропель (50 Е/г) > γ-оксид алюмінію/КВВ, піровуглець (70–90 Е/г) ≈ масивний КВВ (80 Е/г) > сибуніт (90–100 Е/г). Носії, які не містять вуглецевого шару або із синтезованим графітоподібним шаром, як адсорбенти для іммобілізації ГА використовувати недоцільно.

Одержані таким чином біокаталізатори мають високу біокаталітичну активність через 1,5 року зберігання, лімітувальною стадією процесу гідролізу декстринів є зовнішня і внутрішня дифузія субстрату до іммобілізації на пористих носіях ензиму [82].

Іммобілізацію ГА на твердих носіях покладено в основу розроблення й упровадження в промисловому масштабі гетерогенного (багатофазного) процесу оцукрювання крохмалю для виробництва цукристих речовин різного складу і призначення — крохмалевих паток і глюкозних сиропів. Для успішної комерціалізації цього процесу потрібно, щоб активність біокаталізатора забезпечувала 45%-ну конверсію субстрату за 15–20 хв, а час напівактивації біокаталізатора становив 30–120 діб, що відповідало роботі реактора упродовж 312 місяців без перенавантаження [83]. Для промисловості також бажано, щоб біокаталізатор мав високу термостабільність при температурі пастеризації 60 °С і вище. Раніше Г. А. Коваленко зі співавт. [84] вивчили біокаталітичні властивості ГА, іммобілізованої на макроstrukturованих вуглецевмісних керамічних носіях, які розрізняються за морфологією поверхневого вуглецевого шару. Автори з'ясували, що термостабільність ГА, іммобілізованої на алюмосилікатному сотовому моноліті, на поверхні якого було синтезова-

но шар КВВ, підвищується майже в 20 разів порівняно з ензимом у розчині. Час напівактивації такого гетерогенного біокаталізатора при 65 °С у буферному розчині з рН 4,6 — 0,4 доби.

У роботі [85] було показано, що в разі іммобілізації ГА у складі препарату глюкоаваморин на вуглецевому носії сибуніті деякі кінетичні характеристики ензиму, у тому числі константа спорідненості ензиму до субстрату (декстрин зі ступенем полімеризації $n = 2124$) і температурний оптимум ензиматичної реакції, практично не змінюються, водночас термостабільність ензиму значно підвищується порівняно з ензимом у розчині. Було виявлено, що на термостабільність іммобілізованого ензиму суттєвий вплив має субстрат, причому зі збільшенням концентрації декстринів від 1 до 40% термостабільність іммобілізованої ГА лінійно зростає. Показано, що термостабільність ензимсубстратного комплексу, виміряна в 53%-х розчинах декстринів, у 10^5 разів перевищує термостабільність ензиму в розчині без субстрату. Операційна стабільність біокаталізатора, створеного на основі іммобілізованого на сибуніті глюкоаваморину, є достатньо високою, і час напівактивації в модельних технологічних умовах гідролізу декстринів у концентрації 32% при 60 °С становить більше 250 год (30 робочих днів), що цілком відповідає вимогам до біокаталізаторів промислового призначення [86].

Зроблено успішну спробу ковалентно іммобілізувати ГА на целюлозному носії Granocel. Дослідники застосовували оптимізацію на основі заміни якірних груп та методів активації. Показано, що найбільш ефективним є зв'язування ензиму через глутаральдегід на NH_2 -Granocel, який має великий розмір пор та значну кількість функціональних груп. Іммобілізований ензим був стабільним протягом часу зберігання та більш термостабільним [87].

Детальні дослідження структури глікозида дають конкретні практичні результати при конструюванні нових форм ензимів для подальшого використання у промислових технологіях. Можна виділити основні напрями удосконалення амілолітичних ензимів і ГА зокрема: зміни модульної структури; збільшення каталітичної активності ензимів шляхом заміни окремих амінокислот; зміни характеру дії та субстратної специфічності ензимів; збільшення стабільності ензиму. Об'єднання методів протеїнової інженерії з даними щодо структури та механізму дії ГА дозволяє поліпшити влас-

тивості ензимів природних штамів, а генна інженерія дає змогу одержувати ензими в потрібній кількості та без супутніх активностей у разі використання рекомбінантних грибних та бактеріальних продуцентів.

Таким чином, на цей час накопичено значний теоретичний і практичний матеріал

щодо умов синтезу та одержання мікробних ГА, досліджено їхні властивості та встановлено структури деяких ензимів. Усе це дозволяє поглибити знання про механізм дії амілолітичних ензимів, що у свою чергу значно розширює можливості практичного застосування цих ензимів у різних галузях народного господарства.

ЛІТЕРАТУРА

1. Синицын А. П., Марков А. В., Семенова М. В. Микробные биокатализаторы и перспективы развития ферментных технологий в перерабатывающих отраслях АПК. — М., 2004. — С. 95.
2. Галич И. П. Амилазы микроорганизмов. — К.: Наук. думка, 1987. — 192 с.
3. Sinitsyn A. P., Gusakov A. V., Grishutin S. G. et al. Application of microassays for investigation of cellulase abrasive activity and back-staining // J. Biotechnol. — 2001. — V. 89, N2–3. — P. 233–238.
4. Van der Maarel M., van der Veen B., Uitderhaag H. et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family // Ibid. — 2002. — V. 94. — P. 137–155.
5. Crab W., Mitchinson C. Enzymes involved in the processing of starch to sugars // Trends Biotechnol. — 1997. — N15. — P. 349–352.
6. Emmanuel L., Stefan J., Bernard H., Abdel B. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes // Enzyme and Microbiol. Technol. — 2000. — V. 26. — P. 3–14.
7. Anto H., Trivedi U. B., Patel K. C. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate // Bioresour Technol. — 2006. — V. 97, N10. — P. 1161–1166.
8. Fukuda T., Kato-Murai M., Kuroda K. et al. Improvement in enzymatic desizing of starched cotton cloth using yeast codisplaying glucoamylase and cellulose-binding domain // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V. 77, N6. — P. 1225–32.
9. Sivakumar R., Divakar S. Syntheses of N-vanillyl-nonamide glycosides using amyloglucosidase from *Rhizopus* and beta-glucosidase from sweet almond. // Biotechnol. Lett. — 2007. — V. 29, N10. — P. 1537–1548.
10. Sun B., Zhang H., Benjamin D. K. Jr. et al. Enhanced efficacy of an AAV vector encoding chimeric, highly secreted acid alpha-glucosidase in glycogen storage disease type II. // Mol. Ther. — 2006. — V. 14, N6. — P. 822–830.
11. Chien Y. H., Lee N. C., Peng S. F., Hwu W. L. Brain development in infantile-onset Pompe disease treated by enzyme replacement therapy // *Pediatr Res.* — 2006. — V. 60, N3. — P. 349–352.
12. Van der Beek N. A., Hagemans M. L., van der Ploeg A. T. et al. Pompe disease (glycogen storage disease type II): clinical features and enzyme replacement therapy. // *Acta Neurol. Belg.* — 2006. — V. 106, N2. — P. 82–86.
13. Pandey A., Nigam P., Soccol C.R. et al. Advances in microbial amylases // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 2000. — V. 31. — P. 135–152.
14. Frandsen T. P., Christensen T., Stoffer B. et al. Mutational analysis of the roles in catalysis and substrate recognition of arginines 54 and 305, aspartic acid 309 and tryptophan 317 located at subsite 1 and 2 in glucoamylase from *Aspergillus niger* // *Biochemistry.* — 1995. — V. 34, N32 — P. 10162–10169.
15. Fierobe H. P., Stoffer B. B., Frandsen T. P., Svensson B. Mutational modulation of substrate bond type specificity and thermostability of glucoamylase from *Aspergillus awamori* by replacement with short homologue active site sequence and thiol disulfide engineering // *Ibid.* — 1996. — V. 35, N26. — P. 8696–8704.
16. Грачева И. М., Кривова А. Ю. Технология ферментных препаратов. — 3-е изд., перераб. и доп. — М.: Элевар, 2000. — 512 с.
17. Sauer J., Siguroskjold B. W., Christensen U. et al. Glucoamylase: structure/function relationship and protein engineering // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2000. — V. 1543. — P. 275–293.
18. Aleshin A., Golubev A., Firsov L., Honzatko R. Crystal structure of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100 to 2.2-Å resolution. // *J. Biol. Chem.* — 1992. — V. 267, N27. — P. 19291–19298.
19. Harris E., Aleshin A., Firsov L., Honzatko R. Refined structure for the complex of 1-deoxynojirimycin with glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X 100 to 2,4 angstrom resolution // *Biochemistry.* — 1993. — V. 32. — P. 1618–1825.

20. Aleshin A., Hoffman C., Firsov L., Honzatko R. B. Refined crystal structures of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100. // *J. Mol. Biol.* — 1994. — V. 238, N4. — P. 575–591.
21. Stoffer B., Frandsen T., Svensson B., Gajhede M. X-ray structure of an active site mutant glucoamylase, Tyr48CTrp, from *Aspergillus niger*. // *The Carbohydrate Bioengineering Meeting.* — Elsinore, Denmark, 1995, Abstracts. — P. 16.
22. Sevcik J., Solovicova A., Hostinova E. et al. Structure of glucoamylase from *Saccharomyces fibuligera* at 1.7 Å resolution // *Acta Crystallogr.* — 1998. — V. 54. — P. 854–866.
23. Jaffar M. B., Bharat R. P., Norouzi D. et al. Production of glucoamylase by nematophagous fungi *Arthrobotrys* species // *Ind. J. Exp. Biol.* — 1993. — V. 31 — P. 87–89.
24. Norouzi D., Jaffar M. B. Immobilization of glucoamylase produced by fungus *Arthrobotrys amerospor* // *Ibid.* — 1993. — V. 31 — P. 680–681.
25. Frandsen T. P., Fierobe H. P., Svensson B. / Ed. Alberghin L. — Engineering specificity and stability in glucoamylase from *Aspergillus niger* in protein engineering in industrial biotechnology. — Amsterdam: Harwood Academic, 1999. — P. 189–206.
26. Reilly P. J. Protein engineering of glucoamylase to improve industrial properties; a review // *Starch.* — 1999. — V. 51. — P. 269–74.
27. Manjunath P., Shenoy B. C., Raghavendra Rao M. R. Fungal glucoamylases // *J. Appl. Biochem.* — 1983. — V. 5, N4–5. — P. 235–260.
28. Outtrup H. Commercial Enzymes. A Microbiologist role in industry: lecture held at the 15th International Congress of Genetics. — New Delhi, India, Dec.12–21, 1983.
29. Smiley K.—US Patent No.3301768, 1967.
30. Pandya A., Radhakrishna S. Packed bed column for production of enzymes // *Enzyme Microb. Technol.* — 1992. — V. 14. — P. 486–495.
31. Bo J., Hans J., Patel B. et al. Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing waste water // *Process. Biochem.* — 1999. — V. 34. — P. 59–65.
32. Richard J. S., Atul K., Alison M. G. et al. The effect of organic nitrogen sources on recombinant glucoamylase production by *Aspergillus niger* in chemostat culture // *Fungal. Genet. Biol.* — 2000. — V. 31. — P. 125–130.
33. Morita H., Matsunaga M., Mizuno K., Fujio Y. A comparison of raw starch-digesting glucoamylase production in liquid and solid cultures of *Rhizopus strains* // *J. Gen and Appl. Microbiol.* — 1998. — V. 44, N3. — P. 211–216.
34. Chiarello M. D., Soecol C. R., Stertz S. C. et al. Biodegradation of cassava crude starch granules during solid state fermentation by *Rhizopus glucoamylase* // *Arq. biol. tecnol.* — 1997.—V. 40, N3.—P. 771–785.
35. Rajoka M., Yasmeeen A. Induction and production studies of a novel glucoamylase of *Aspergillus niger* // *World J. Microbiol. and Biotechnol.* — 2005. — V. 21, N2. — P. 179–187.
36. Shigechi H., Koh J., Fujita Y. et al. Direct production of ethanol from raw com starch via fermentation by use of a novel surface engineered yeast strain codisplaying glycoamylase and α -amylase // *Appl. and Environ Microbiol.* — 2004. — V. 70, N8. — P. 5037–5040.
37. Bhatti H. H., Rashid M. H., Hawaz R. et al. Optimization of media for fermentation by *Fusarium solani*. // *Food Technol. and Biotechnol.* — 2007. — V.45, N1 — P. 51–56.
38. Chavez R. A., Carvalho J. C. M., Converti A. et al. Production of α -amylase and glucoamylase from different starches by a new *Trichoderma* sp. isolate // *Appl. Microbiol.* — 2004. — V. 54, N2. — P. 169–180.
39. Chavez R. A., Carvalho J. C. M., Converti A. et al. Influence of the nitrogen source on the production of α -amylase and glucoamylase by a new *Trichoderma* sp. from soluble starch // *Chem. and Biochem. Eng. Quart.* — 2004. — V.18, N4. — P. 403–407.
40. Kumar S., Kumar P., Satyanarayana T. Production of raw starch-saccharifying thermostable and neutral glucoamylase by the thermophilic mold *Thermomucor indicae-seudaticae* in submerged fermentation. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2007. — V. 142, N3. — P. 221–230.
41. Kumar P., Satyanarayana T. Economical glucoamylase production by alginate-immobilized *Thermomucor indicae-seudaticae* in cane molasses medium. // *Lett. Appl. Microbiol.* — 2007. — V. 45, N4. — P. 392–397.
42. Bertolin T. E., Schmidell W., Maiorano A. E. et al. Influence of carbon, nitrogen and phosphorous sources on glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation // *Z. Naturforsch [C].* — 2003. — V. 58, N9–10. — P. 708–712.
43. Zhu J. C., Wang X. J., Zhang G. et al. Glucoamylase enhancement regulated by blue light in *Aspergillus niger* // *Wei Sheng Wu Xue Bao.* — 2006. — V. 46, N5. — P. 734–739.
44. Svensson B., Larsen K., Gunnarsson A. Characterization of glucoamylase G2 from *Aspergillus niger* // *Eur. J. Biochem.* — 1986. — V. 154. — P. 497–502.

45. Ковалева Т. А. О механизме действия и строении активного центра глюкоамилазы // Вестник ВГУ. Серия химия, биология. — 2000. — С. 104–107.
46. Kaneko A., Sudo S. Molecular cloning and determination of nucleotide sequence of a gene encoding an acid stable α -amylase from *Aspergillus kawachi* // Ferment. Bioeng. — 1996. — V. 81. — P. 292–298.
47. Neustroev K. N., Valter S. N., Timchenko M. V. et al. Adsorption of glucoamylase from *Aspergillus awamori* X-100/D27 on cell wall // Biochem. Mol. Biol. Int. — 1993. — V. 30. — P. 115–120.
48. Cutinho M. P., Reilly P. J. Glucoamylase: structural, functional and evolutionary relationship // Proteins. — 1997. — V. 29. — P. 334–347.
49. Liu F., Li W., Ridgway D. et al. Inhibition of extracellular protease secretion by *Aspergillus niger* using immobilization // Biotechnol. Lett. — 1998. — V. 29, N6. — P. 536–542.
50. Gregg L. F. W., Richard J. S., Robert A. et al. The effect of pH on glucoamylase production glycosylation and chemostat evolution of *Aspergillus niger* // Biochim. Biophys. Acta. — 2001. — V. 1527. — P. 112–22.
51. Pedersen H., Beyer M., Nielson J. Glucoamylase production in batch, chemostat and fed batch cultivation by an industrial strain of *Aspergillus niger* // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2000. — V. 53. — P. 272–277.
52. Xu J., Wang L., Ridgway D., Gu T. et al. Increased heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation through extracellular protease inhibition by pelleted growth. // Biotechnol. Prog. — 2000. — V. 16. — P. 222–227.
53. Dock C., Hess M., Antranikian G. A. Thermoactive glucoamylase with biotechnological relevance from the thermoacidophilic Euryarchaeon *Thermoplasma acidophilum* // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V. 78, N1. — P. 105–514.
54. Chen J., Zhang Y. Q., Zhao C. Q. et al. Cloning of a gene encoding thermostable glucoamylase from *Chaetomium thermophilum* and its expression in *Pichia pastoris* // J. Appl. Microbiol. — 2007. — V. 103, N6. — P. 2277–2284.
55. Michelin M., Ruller R., Ward R. J. et al. Purification and biochemical characterization of a thermostable extracellular glucoamylase produced by the thermotolerant fungus *Paecilomyces variotii* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V. 35, N1. — P. 17–25.
56. Tachibana S., Yasuda M. Purification and characterization of heterogeneous glucoamylases from *Monascus purpureus* // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2007. — V. 71, N10. — P. 2573–2576.
57. Feng B., Hu W. et al. Purification, characterization, and substrate specificity of a glucoamylase with steroidal saponin-rhamnoidase activity from *Curvularia lunata* // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — V. 76, N6. — P. 1329–1338.
58. Thorsen T. S., Johnsen A. H., Josefsen K., Jensen B. Identification and characterization of glucoamylase from the fungus *Thermomyces lanuginosus* // Biochim. Biophys. Acta. — 2006. — V. 1764, N4. — P. 671–676.
59. Suresh C., Dubey A. K., Srikanth S., Kumar U. S. Characterization of starch hydrolyzing enzyme of *Aspergillus niger* // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1999. — V. 51. — P. 673–675.
60. Ueda S. Fungal glucoamylase and raw starch digestion // TIBS Mar. — 1981. — P. 89–90.
61. Spinelli B. B. L., Lourdes M., Polizeli T. M. et al. Biochemical characterization of glucoamylase from the hyper producer exo-1 mutant strain of *Neurospora crassa* // FEMS Microbiol. Lett. — 1996. — V. 138. — P. 173–177.
62. Le Gal-Goefer, Jack M. F., Sorimachi A. J. et al. Expression *Aspergillus niger* of the starch binding domain of glucoamylase, Comparison with the proteolitically produced starch binding domain // Eur. J. Biochem. — 1995. — V. 233. — P. 561–567.
63. Ковалева Т. А., Селеменов В. Ф., Гречкина В. Р. Некоторые свойства глюкоамилазы // Труды III Всесоюз. междуниверситет. конференции по физ.-хим. биологии. — Тбилиси, 1982. — С. 240–241.
64. Ковалева Т. А., Селеменов В. Ф., Плохих А. М. Изучение некоторых свойств глюкоамилазы сорбционными и спектральными методами // Теория и практика сорбционных процессов. — Воронеж, 1985. — Вып. 17. — С. 58–61.
65. Ковалева Т. А., Башарина О. В., Селеменов В. Ф. Исследование структуры глюкоамилазы методом ИК спектроскопии // Тезисы докладов VII Всесоюз. конференции по спектроскопии биополимеров. — Харьков, 1991. — С. 134–135.
66. Norouzi D., Rostami K., Nouri I. D., Saleh M. Subsite mapping of purified glucoamylases I, II, III produced by *Arthrotrichum amerospora* ATCC 34468 // World J. Microbiol. Biotechnol. — 2000. — V. 16. — P. 155–161.
67. Ono K., Shintani K., Shikata S. Competitive studies of various molecular species in *Aspergillus niger* glucoamylase // Agric. Biol. Chem. — 1988. — V. 52, N7. — P. 1699–1706.
68. Venkataramu K., Manjunath P., Rao M. R. R. Glucoamylase of *Aspergillus niger* NRRL 330 // Ind. J. Biochem. Biophys. — 1975. — N12. — P. 107–114.
69. Fagerstrom R., Kalkkinen N. Characterization, subsite mapping and partial amino acid

- sequence of glucoamylase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei* // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 1995. — V. 21, Pt. 2. — P. 223–231.
70. Aquino A. C., Jorge J. A., Terenzi H. F., Polizeli M. L. Thermostable glucose-tolerant glucoamylase produced by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* // *Folia Microbiol. (Praha)*. — 2001. — V. 46, N1. — P. 11–16.
71. Okolo B. N., Ire F. S., Ezeogu L. I. et al. Purification and some properties of a novel raw starch-digesting amylase from *Aspergillus carbonarius* // *J. Sci. Food. Agric.* — 2001. — V. 81, N3. — P. 329–336.
72. Hiromi K., Nitta Y., Ono S. Subsite affinities of glucoamylase: examination of the validity of the subsite theory // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1973. — V. 362. — P. 362–375.
73. Meagher M. M., Nikolov Z. I., Reilly P. J. Subsite mapping of *Aspergillus niger* glucoamylases I and II with maltooligosaccharides // *Biotechnol. Bioeng.* — 1989. — V. 34 — P. 681–688.
74. Kazuhisa O., Sieko S., Satoru O. Effective purification of glucoamylase in koji, a solid culture of *Aspergillus oryzae* on steamed rice by affinity chromatography using an immobilized acarbose (BAYg-5421) // *Agric. Biol. Chem.* — 1988. — V. 52. — P. 1707–1714.
75. Christensen T., Stoffer B. B., Svensson B., Christensen U. Some details of the reaction mechanism of glucoamylase from *Aspergillus niger*. Kinetics and structural studies on Trp52YPhe and Trp317YPhe mutant // *Eur. J. Biochem.* — 1997. — V. 250, N3. — P. 638–645.
76. Попов Е. М. Структурно-функциональная организация белков.—М.: Наука, 1992. — 358 с.
77. Winchester B., Bali D., Bodamer O. A. et al. Methods for a prompt and reliable laboratory diagnosis of Pompe disease: Report from an international consensus meeting // *Mol. Genet. Metab.* — 2008. — V. 93, N3. — P. 275–281.
78. Cao L. Immobilized enzymes: science or art? // *Curr. Opin. Chem. Biol.* — 2005. — N9. — P. 217–226.
79. Roy I., Gupta M. N. Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylases and pullulanase entrapped in calcium alginate beads // *Enzyme and Microbiol. Technol.* — 2004. — V. 34. — P. 26–32.
80. Введение в прикладную энзимологию/ Ред. И. В. Березин, В. К. Антонов, К. Мартинек.— М.: Изд-во МГУ, 1982. — 383 с.
81. Коваленко Г. А., Перминова Л. В., Плаксин Г. В. и др. Имобилизованная глюкоамилаза — биокатализатор процесса гидролиза декстринов // *Прикл. биохим. и микробиол.* — 2006. — Т. 42, №2. — С. 163–158.
82. Перминова Л. В., Коваленко Г. А., Чуенко Т. В. и др. Имобилизованная глюкоамилаза — гетерогенный биокатализатор гидролиза декстринов // 3-й Моск. междунар. конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». — М., 2005. — С. 205.
83. Daniels M. J. *Process Eng. Aspects Immobilized Cell Systems*, 1986. — P. 218–224.
84. Коваленко Г. А., Комова О. В., Симаков А. В. и др. Углеродосодержащие макроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов и микроорганизмов. 2. Биокаталитические свойства адсорбированной глюкоамилазы // *Биотехнология.* — 2002. — №5. — С. 81–93.
85. Коваленко Г. А., Перминова Л. В., Терентьева Т. Г., Плаксин Г. В. Каталитические свойства глюкоамилазы, иммобилизованной на углеводном носителе сибуните // *Прикл. биохим. и микробиол.* — 2007. — Т. 43, №4. — С. 412–418.
86. Коваленко Г. А., Комарова О. В., Боровцова О. Ю., Рудина Н. А. Биокаталитические свойства адсорбированной глюкоамилазы // *Биотехнология.* — 2002. — №5. — С. 81–93.
87. Bryjak J., Anilyte J., Liesiene J. Evaluation of man-tailored cellulose-based carriers in glucoamylase immobilization // *Carbohydr. Res.* — 2007. — V. 342, N8. — P. 1105–1109.

**ГЛЮКОАМИЛАЗА МИКРООРГАНИЗМОВ.
БИОСИНТЕЗ, СВОЙСТВА,
МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ
И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

Н. В. Борзова, О. В. Гудзенко, Л. Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии НАН
Украины, Киев

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

В обзоре представлены данные по систематическому положению глюкоамилаз в современной классификации. Изложены современные взгляды на регуляцию биосинтеза микробных глюкоамилаз, освещены вопросы, касающиеся структуры и функций отдельных доменов молекулы энзима, их взаимосвязи и роли в катализе. Детально описаны физико-химические свойства глюкоамилаз грибного происхождения, показана возможность эффективной иммобилизации энзимов на различных носителях с целью использования последних в различных технологических процессах.

Ключевые слова: глюкоамилаза, биосинтез, строение активного центра, механизм действия, свойства энзима, иммобилизация глюкоамилаз, практическое использование.

**GLUCOAMYLASE OF MICROORGANISMS.
BIOSYNTHESIS, PROPERTIES,
MECHANISM OF ACTION
AND APPLICATION**

N. V. Borzova, O. V. Gudzenko, L. D. Varbanets

Institute of Microbiology and Virology of
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

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

Data on regular position of glucoamylase in modern classification are given in the review. Current views on regulation of microbial glucoamylases biosynthesis are stated, the issues concerning structure and functions of individual domains of enzyme molecule, their interrelation and role in catalysis are discussed. Physical and chemical properties of fungal glucoamylases are detailed. Possibility of effective immobilization of enzymes on various carriers with the purpose of their using in various technological processes was shown.

Key words: glucoamylase, biosynthesis, active centre structure, mechanism of action, enzyme properties, glucoamylase immobilization, practical use.