

В. Г. РЫЖАКОВА

## ГИДРОЛИЗ СУБСТРАТОВ ГЛЮКОАМИЛАЗОЙ ASPERGILLUS AWAMORI

(Представлено академиком А. И. Опариным 14 VII 1971)

Глюкоамилазы (К.Ф.3.2.1.3), выделенные из различных источников, способны осуществлять гидролиз не только  $\alpha$ -1,4-связей, но и  $\alpha$ -1,6-гликозидных связей в поли- и олигосахаридах (<sup>1-6</sup>). Некоторые из них способны гидролизовать  $\alpha$ -1,3-гликозидные связи в нигерозе (<sup>7</sup>) и  $\alpha$ -1,2-связи в койбиозе (<sup>8</sup>). Имеются указания (<sup>9, 10</sup>), что сахароза (1- $\alpha$ -D-гликопиранозил-2 $\beta$ -D-фруктофуранозид) относится к субстратам, которые очень слабо гидролизуются глюкоамилазой.

Гомогенный препарат глюкоамилазы был выделен из фильтрата глубинной культуры *Aspergillus awamori*. Специфичность очищенного препарата глюкоамилазы проверяли по действию на субстраты с различными типами связей. Смесь фермента с субстратом (крахмал, гликоген, амилоза, амилопектин, мальтоза, изомальтоза, декстран, сахароза, инулин) инкубировали при 30°, рН 4, 6, и через различные интервалы времени определяли степень гидролиза субстратов по количеству образовавшейся глюкозы (методом с глюкозооксидазой).

Сравнение скорости гидролиза исследуемых субстратов показало, что за 6 час. крахмал, гликоген, амилоза и амилопектин гидролизуются гораздо быстрее, чем мальтоза и изомальтоза при одних и тех же концентрациях фермента. Однако все эти субстраты за 24 часа расщеплялись полностью до глюкозы. Полный гидролиз крахмала, гликогена, амилозы, амилопектина, мальтозы и изомальтозы показывает, что гомогенная глюкоамилаза *A. awamori* способна расщеплять как  $\alpha$ -1,4- так и  $\alpha$ -1,6-гликозидные связи в субстратах.

В отличие от глюкоамилаз животного происхождения, глюкоамилаза *A. awamori* не расщепляет декстран.

Неожиданным фактом оказалось то, что глюкоамилаза *Asp. awamori* расщепляла сахарозу со скоростью, в два раза превышающей скорость гидролиза крахмала.

Так как характерной особенностью сахарозы является исключительная легкость ее гидролиза в кислых условиях среды, то было проверено влияние используемого ацетатного буфера рН 4,6 на гидролиз сахарозы. Результаты опыта показали, что под влиянием ацетатного буфера происходит лишь частичный гидролиз сахарозы (6,7% глюкозы за 6 час.), а при ферментативном расщеплении сахарозы в этом же буфере процент гидролиза составлял 96—97%, т. е. за 6 час. наблюдалось полное расщепление сахарозы.

Результаты хроматографического исследования гидролиза сахарозы глюкоамилазой *A. awamori* также подтверждают то, что за 6 час. происходит полное расщепление сахарозы (рис. 1А). Следовательно, глюкоамилаза *A. awamori* способна расщеплять гликозидную связь в сахарозе. Это свойство глюкоамилазы исследуемого нами штамма *A. awamori* было проверено на разных образцах сахарозы, хроматографически чистых и не содержащих примесей глюкозы.

Для подтверждения способности глюкоамилазы *A. awamori* расщеплять связь в сахарозе был проведен ферментативный гидролиз инулина. Это — линейный полисахарид, в котором цепи связанных (2—1)  $\beta$ -D-фруктофуранозных остатков оканчиваются  $\alpha$ -D-глюкопиранозным остатком, присоединенным как в сахарозе. В результате в гидролизате инулина было обнаружено 4,8% глюкозы (методом с глюкозооксидазой). Хроматографическое исследование продуктов гидролиза инулина (рис. 1 Б) показало, что в ферментативном гидролизате инулина были обнаружены следы сахарозы, глюкозы и довольно большое количество фруктозы. На хроматограмме также показано, что образование сахарозы, глюкозы и фруктозы из инулина идет не за счет добавления ацетатного буфера pH 4,6 и не за счет шестичасового нагревания при 30°, а только в результате ферментативного расщепления инулина. Исследуемые образцы инулина были хроматографически чистыми. Определение общего количества образовавшихся из инулина восстанавливающих сахаров показало, что за 6 час. при 30° расще-

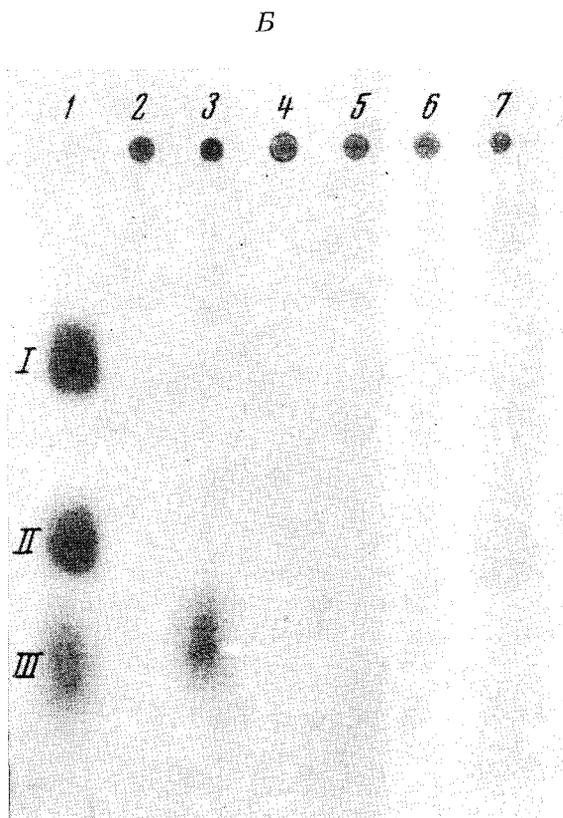
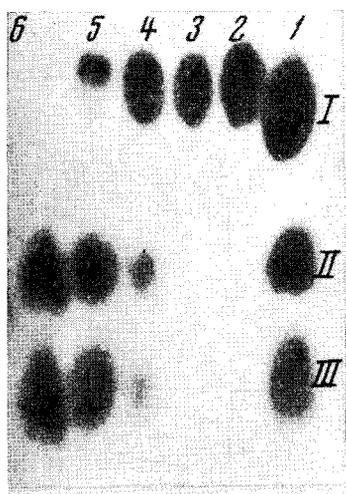


Рис. 1. Хроматография сахаров, образовавшихся в результате гидролиза глюкоамилазой *A. awamori* сахарозы (А) и инулина (Б). Для А: I — метчики: I — сахароза, II — глюкоза, III — фруктоза; 2 — субстрат (сахароза 1%); 3 — нулевая проба с ферментом; 4—6 — гидролиз сахарозы: 4—1 час, 5—3 часа, 6—6 час. Для Б: I — метчики: I — сахароза, II — глюкоза, III — фруктоза; 2 — нулевая проба с ферментом; 3 — инулин + фермент, гидролиз 6 час.; 4 — инулин + ацетатный буфер pH 4,6, без нагревания; 5 — инулин + ацетатный буфер pH 4,6, нагревание 6 час.; 6 — инулин + вода, нагревание при 30°, 6 час.; 7 — инулин + вода, без нагревания. Система растворителей: *n*-бутанол — ацетон — вода (6:2:1); проявитель — нафторезорцин

пляется 42% инулина, что и объясняет интенсивно окрашенное пятно фруктозы на хроматограмме. Следовательно, глюкоамилаза *A. awamori*, кроме глюкозидной связи в сахарозе, способна расщеплять 2-1 $\beta$ -D-фруктофуранозные связи в инулине.

Японские исследователи Ватанабе и Фукимбара<sup>(11)</sup> показали, что кислотоустойчивая глюкоамилаза *A. awamori* var. *fumeus* 1В-42, хотя и отно-

сится к  $\alpha$ -глюкозидазам, не способна гидролизовать 1,1- $\alpha$ -трегалозу, в то время как 1,1- $\beta$ -трегалоза полностью расщеплялась этим ферментом.

Поэтому мы провели ферментативный гидролиз трегалозы (1,1- $\alpha$ ), целлобиозы (1,4- $\beta$ ) и гентиобиозы (1,6- $\beta$ ) глюкоамилазой *A. awamori*. После 24-часовой инкубации этих дисахаридов с глюкоамилазой глюкоза не была обнаружена.

Таким образом, и глюкоамизала исследуемого штамма *A. awamori* оказалась неспособной гидролизовать  $\alpha$ - $\alpha$ -трегалозу.

Данные настоящей работы свидетельствуют о том, что кислотоустойчивая глюкоамилаза *A. awamori* обладает широкой субстратной специфичностью и способна полностью расщеплять не только крахмал, его компоненты (амилозу, амилопектин), гликоген, мальтозу и изомальтозу, но также и сахарозу и инулин.

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
12 VII 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> J. Tsujisaka, J. Fukumoto, T. Jamamoto, *Nature*, **181**, 770 (1958).  
<sup>2</sup> J. H. Pazur, T. Ando, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1966 (1959). <sup>3</sup> T. Sawasaki, *Rikagaku kenkyusho hokoku*, **36**, 590 (1960). <sup>4</sup> J. Fukumoto, *Sci. and Ind.*, **36**, 483 (1962). <sup>5</sup> S. Ono, K. Hiromi, J. Hamauzu, *J. Biochem.*, **59**, 34 (1965). <sup>6</sup> K. Watanabe, T. Fukimbara, *J. Ferm. Technol.*, **44**, 251 (1966). <sup>7</sup> J. Hattori, *Die Starke*, **3**, 8286 (1965). <sup>8</sup> H. Ueyama, T. Fukimbara, G. Terui, *J. Ferm. Technol.*, **43**, 481 (1965). <sup>9</sup> S. A. Barker, E. A. Bourne, J. C. Fleetwood, *J. Chem. Soc.*, **12**, 4857 (1957). <sup>10</sup> J. H. Pazur, K. Kleppe, *J. Biol. Chem.*, **237**, 1002 (1962).  
<sup>11</sup> K. Watanabe, T. Fukimbara, *J. Ferm. Technol.*, **45**, 335 (1967).