

Академик АН ГрузССР С. В. ДУРМИШИДЗЕ, Г. Н. КВЕСИТАДЗЕ,
Г. Н. КОКОНАШВИЛИ

ГЛЮКОАМИЛАЗА *ASPERGILLUS AWAMORI*

Фермент глюкоамилаза (К.Ф.3.2.1.3), продуцируемая различными микроорганизмами, гидролизует крахмал и родственные ему полисахариды до *D*-глюкозы и широко используется при ферментативном получении глюкозы из крахмала. Однако глюкоамилазы, выделенные из различных представителей плесневых грибов рода *Aspergillus* и часто даже из одного штамма, отличаются рядом физико-химических свойств, таких как молекулярный вес и аминокислотный состав, количество углеводных остатков в молекуле фермента, субстратная специфичность и т. д. (¹⁻³). Такие отличия в строении фермента проявляются в различной кислотоустойчивости, рН-оптimumе действия и в ряде других свойств глюкоамилаз плесневых грибов. Исходя из этого, в настоящей работе была поставлена задача изучить глюкоамилазу мутанта, полученного ультрафиолетовым облучением исходной культуры плесневого гриба *Asp. awamori* как одного из наиболее активных продуцентов этого фермента. Указанная культура в глубинных условиях выращивания продуцирует две формы глюкоамилазы. Одна из форм фермента была получена в гомогенном виде и были изучены ее свойства.

Молекулярный вес глюкоамилазы определяли с помощью откалиброванной колонки с сефадексом С-100 и методом неустановившегося равновесия на ультрацентрифуге «МОН-3170» (метод Арчибальда). Расчет проводили как в области мениска, так и в области дна ячейки по Шахману (⁴). N-концевую аминокислоту фермента определяли методом дансильирования по Хартли и Грею (⁵). Дансильные производные аминокислот идентифицировали двухмерной тонкослойной хроматографией на пластинках с силикагелем марки КСК. Аминокислотный анализ фермента проводили на анализаторе «Хитачи» по методу Спекмана и др. (⁶): белок гидролизovali 6*N* HCl в течение 24, 48 и 72 час. Количество остатков триптофана и тирозина определяли по методу Гудвина и Мортонa (⁷). Субстратную специфичность глюкоамилазы изучали по действию фермента на субстраты с различными типами глюкозидных связей. Смесь с субстратом инкубировали при температуре 50° и рН 4,7 и через определенное время по количеству образовавшейся глюкозы определяли степень гидролиза субстрата глюкоамилазой.

Молекулярный вес глюкоамилазы *Asp. awamori*, рассчитанный по методу Арчибальда, был равен 62 000, что близко к величине 64 000, полученной нами с помощью откалиброванной колонки с сефадексом G-100. Тонкослойный хроматографический анализ дансильированного фермента показал, что глюкоамилаза содержит одну N-концевую аминокислоту, а именно валин. Ниже приводятся данные аминокислотного анализа глюкоамилазы *Asp. awamori*, молекулярный вес которой был принят равным 62 000.

Количество остатков валина и изолейцина получено после 72 час. гидролиза, а количество серина и треонина экстраполировано к нулевому времени гидролиза. Спектроскопическое исследование глюкоамилазы в ультрафиолетовой области спектра показало, что триптофан в ферменте отсутствует.

Изучение субстратной специфичности глюкоамилазы показало, что фермент полностью расщепляет до глюкозы крахмал, гликоген, амилозу, амиллопектин, мальтозу, изомальтозу и не действует на трегалозу, целлобиозу

Аминокислоты	Число остатков на молекулу фермента	Аминокислоты	Число остатков на молекулу фермента
Аспарагиновая кислота	72	Фенилаланин	20
Серин	75	Аргинин	14
Треонин	57	Изолейцин	23
Глутаминовая кислота	51	Пролин	20
Аланин	57	Лизин	7
Лейцин	44	Гистидин	7
Валин	32	Метионин	5
Тирозин	20	1/2 Цистин	5
Глицин	43		

и гентиобиозу, т. е. фермент способен расщеплять субстраты с α -1,4 и α -1,6 и не действует на α -1,1, β -1,4 и β -1,6 глюкозидные связи в субстратах. Крахмал, гликоген, амилоза и амилопектин гидролизуются ферментом в два раза быстрее, чем мальтоза и изомальтоза. В литературе имеются противоположные данные о возможности гидролиза связи α -1,2 в сахарозе плесневыми глюкоамилазами. Показано (6), что глюкоамилаза одного из штаммов *Asp. awamori* расщепляла сахарозу со скоростью, в два раза превышающей скорость гидролиза крахмала (8). Глюкоамилаза нашего штамма также гидролизовала сахарозу, но со скоростью гораздо меньшей, чем крахмал. Таким образом, глюкоамилаза *Asp. awamori* способна расщеплять как α -1,4, α -1,6, так и α -1,2 глюкозидные связи в субстратах, причем рН-оптимум действия фермента на субстраты с указанными связями лежит в пределах 4,6–4,8. Такая полиспецифичность глюкоамилазы не вызвана примесью других ферментов в препарате фермента, так как данные анализа скорости седиментации, диск-электрофореза в полиакриламидном геле и наличие одной N-концевой аминокислоты в ферменте свидетельствуют о том, что глюкоамилаза была гомогенна.

Авторы выражают благодарность проф. Р. В. Фениксовой за любезно предоставленный мутантный штамм плесневого гриба *Asp. awamori*.

Институт биохимии растений
Академии наук ГрузССР
Тбилиси

Поступило
26 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. R. Lineback, A. L. Aira, R. L. Horner, *Cereal Chem.*, v. 49, 283 (1972). ² D. R. Lineback, W. E. Baumann, *Carbohydr. Res.*, v. 14, 341 (1970). ³ J. H. Pazur, T. Ando, *J. Biol. Chem.*, v. 234, 1966 (1959). ⁴ H. K. Schachman, *Methods in Enzymology*, v. 4, N. Y., 1957, p. 32. ⁵ W. R. Gray, B. B. Hartley, *Biochem. J.*, v. 89, 59 (1963). ⁶ D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore, *Anal. Chem.*, v. 30, 1190 (1958). ⁷ T. W. Goodwin, R. A. Morton, *Biochem. J.*, v. 40, 628 (1946). ⁸ В. Г. Рыжикова, ДАН, т. 204, 737 (1972).