

## МІКРОБНІ $\alpha$ -ГЛЮКОЗИДАЗИ: КЛАСИФІКАЦІЯ, СУБСТРАТНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА МЕХАНІЗМ ДІЇ

Н. В. БОРЗОВА

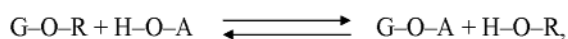
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

E-mail: [nv\\_borzova@bigmir.net](mailto:nv_borzova@bigmir.net)

В огляді наведено дані літератури щодо систематичного положення мікробних  $\alpha$ -глюкозидаз у сучасній номенклатурі ензимів, яка ґрунтується на їхній субстратній специфічності та молекулярній будові. Подано відомості стосовно розповсюдженості цих ензимів серед мікроорганізмів, у тому числі екстремофільних, їхніх фізико-хімічних і каталітичних властивостей, а також субстратної специфічності та механізму дії.

**Ключові слова:**  $\alpha$ -глюкозидаза, класифікація, властивості, специфічність, механізм дії.

$\alpha$ -Глюкозидази (ЕС 3.2.1.20,  $\alpha$ -D-глюкозид-глюкогідролази) — карбогідрази екзотипу, які вивільняють  $\alpha$ -глюкозу з невідновлювального кінця ланцюга субстрату.  $\alpha$ -Глюкозидази поширені серед мікроорганізмів, рослин та в тканинах тварин. Субстратна специфічність цих ензимів надзвичайно різноманітна. Багато  $\alpha$ -глюкозидаз здатні гідролізувати не тільки синтетичні  $\alpha$ -глюкозиди та олігосахариди, які містять  $\alpha$ -глюкозидні зв'язки, але й  $\alpha$ -глюкани, такі як розчинний крохмаль і глікоген.  $\alpha$ -Глюкозидази часто називають трансглюкозидазами через їхню здатність (зокрема частини з них) каталізувати як гідроліз, так і трансглюкозилування. Ці реакції можна зобразити за такою схемою:



де G, R і H-O-A — глюкозильний залишок, аглікон і акцептор відповідно. Як гідроліз, так і трансглюкозилування з формального погляду — це обмінні реакції між глюкозильними залишками і протонами води або акцептора. У цих реакціях глюкоза вивільнюється як  $\alpha$ -аномер, і конфігурація аномерного центру субстрату (C<sub>1</sub>) зберігається в продукті трансглюкозилування. У цьому відмінність  $\alpha$ -глюкозидаз від глюкоамілаз, які каталізують гідроліз тих самих субстратів — в останньому випадку продуктом реакції є  $\beta$ -глюкоза, тобто відбувається обер-

тання конфігурації при C<sub>1</sub> у залишку глюкози, який відщеплюється. Крім того, глюкоамілази не каталізують реакцію трансглюкозилування. Chiba [1] запропонував розділити  $\alpha$ -глюкозидази на три групи залежно від типу субстрату. Перша група — це типові  $\alpha$ -глюкозидази, що гідролізують такі субстрати, як феніл- $\alpha$ -глюкозид або сахарозу, швидше, ніж мальтозу. Друга група — це так звані «мальтази», які швидко гідролізують мальтоолігосахариди, але не активні щодо синтетичних  $\alpha$ -глюкозидів та сахарози. До третьої групи увійшли ензими, що мають як мальтазну, так і  $\alpha$ -глюканазну активність.

За сучасною класифікацією  $\alpha$ -глюкозидази потрапляють у дві родини — 13 і 31 [2]. Оліго-1,6-глюкозидази (ЕС 3.2.1.10) і сахарозо- $\alpha$ -глюкозидази (ЕС 3.2.1.48), хоча їх і не віднесено до однієї з 81 родин, також входять до категорії  $\alpha$ -глюкозидаз. Циклодекстрин-глюканотрансферази (ЕС 2.4.1.19) належать до родини 13.

Нещодавно Chiba [3] запропонував дещо іншу класифікацію  $\alpha$ -глюкозидаз, яка також ґрунтується на виявленні гомологічних ділянок в амінокислотних послідовностях цих ензимів. Він виявив чотири консервативні ділянки в амінокислотних послідовностях  $\alpha$ -глюкозидаз дріжджів, бацил, комах (табл. 1). Ці ж чотири консервативні ділянки виявлено в декстранглюкозидазі зі *Streptococcus mutants*,  $\alpha$ -амілазах (ЕС 3.2.1.70) і трегалозо-6-фосфатгідролазі (ЕС

Таблиця 1. Консервативні блоки в амінокислотних послідовностях  $\alpha$ -глюкозидаз [4]

Ензим	Регион				
	1	2	3	4	5
<b>Родина 1</b>					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> АГ	106-DLWNH	210-GFRIDTAGL	276-EVAH	344-Y1ENHD	
<i>Bacillus sp.</i> (SAM1606) АГ	113-DLWNH	210-GFRMDVINA	71-ETGG	340-YWTNHD	
<i>Candida albicans</i> АГ	98-DLWNH	202-GFRIDTAGM	263-EVGH	333-FIENHD	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> АГ	100-DLWNH	197-GFRMDVINQ	256-ETHG	327-FWNNHD	
<i>Thermus caldophilus</i> АТ	96-DLWNH	194-GFRVDVLWL	245-EMRQ	322-VLGNHD	
<i>Streptococcus mutans</i> ДГ	98-DLWNH	190-GFRMDVIDM	236-ETWG	308-FWNNHD	
<i>Escherichia coli</i> ТФГ	100-DLWNH	196-GLRLDWNL	25I-EMSS	320-FWCNHD	
<i>Bacillus subtilis</i> ТФГ	101-DLWNH	198-GFRLDVINL	253-EMSS	324-FWCNHD	
<i>Bacillus thermoglucosidasius</i> ОГ	98-DLWNH	195-GFRMDVINM	256-ETPG	325-YLNNHD	
<i>Bacillus coagulans</i> ОГ	97-DLWNH	195-GWRMDVIGS	255-EAIG	327-YFENHD	
<i>Bacillus cereus</i> ОГ	98-DLWNH	195-GFRMDVINF	255-EMPG	324-YWNNHD	
<i>Bacillus sp.</i> ОГ	97-DLWNH	194-GWRMDVIGS	254-EAGG	326-YFENHD	
<b>Родина 2</b>					
<i>Aspergillus niger</i> АТ		220-GWVYD.MSEV	255-EPGD	316-YVINHD	421-GADTCGF
<i>Aspergillus oryzae</i> АГ		488-GVWYDMAEV	523-EPGN	583-WINHV	687-GVDTCGF
<i>Emericella nidulans</i> АГ		496-GVWYDMSEV	531-EPGN	593-YVINHV	697-GVDTCGF
<i>Mucor javanicus</i> АГ		426-GLWIDMNEP			594-GAD1CGF
<i>Schwanniomycetes occidentalis</i> АГ		466-GIWADMNEV			665-GADVCGF
<b><math>\alpha</math>-Глюкозидази, які не мають консервативних блоків</b>					
<i>Sulfolobus solfataricus</i> АГ					
<i>Thermotoga maritima</i> АГ					

Примітки: АГ —  $\alpha$ -глюкозидаза; ДГ — декстранглюкозидаза; ТФГ — трегалоза-6-фосфатгідролаза ( $\alpha$ , $\alpha$ -фотрегалаза); ОГ — оліго-1,6-глюкозидаза. Жирним шрифтом виділено основні консервативні амінокислоти.

3.2.1.93) з *Escherichia coli*. Обидва останні ензими каталізують гідроліз синтетичного субстрату *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-глюкозиду. За класифікацією Chiba [1] ці ензими належать до родини I. У  $\alpha$ -глюкозидаз із тканин свавців, рослин, *Candida tsukubaensis* і *Mucor javanicus* відсутні ділянки 1, 3 і 4, а в  $\alpha$ -глюкозидаз з *Aspergillus niger* і *A. oryzae* — ділянка 1, водночас для цих ензимів характерна поява п'ятої консервативної ділянки. Ці ензими входять до родини II.

На сьогодні встановлено структуру глюкозидази екзотипу — оліго-1,6- $\alpha$ -глюкозидази з *B. cereus* [5]. Ензим складається з трьох доменів — N-кінцевого (амінокислоти): 1 — 104 та 175 — 480), що має структуру  $(\beta/\alpha)_8$ -барелу з додатковими  $\alpha$ -спіралями, субдомену (АК: 105 — 174), в який входить  $\alpha$ -спіраль, тринитковий антипаралельний  $\beta$ -лист і довгі петлі, та C-кінцевого домену (АК: 481–558) у вигляді  $\beta$ -барелу з восьми антипаралельних  $\beta$ -ниток. Три каталітичні за-

лишки — Asp199, Glu255, Asp329 — розташовані в глибокій щілині, яка утворена субдоменом та кластером спіралей  $(\beta/\alpha)_8$ -барелу. Також було показано, що для бациллярної екзо- $\alpha$ -1,4-глюкозидази характерна така сама вторинна структура N-термінальної ділянки  $[(\alpha/\beta)_8$ -барел], як і для бациллярної оліго- $\alpha$ -1,6-глюкозидази [6]. В останні роки одержано попередні результати щодо структури 6-фосфо- $\alpha$ -глюкозидази із *B. subtilis* [7]. Цей ензим залучається в катаболізм  $\alpha$ -глюкозидів, що утворюються через фосфоенолпіруватзалежну мальтозну трансферазну систему у *B. subtilis*.

Встановлено, що більшість глюкозидаз є глікозилітованими протеїнами. З'ясовано, що не тільки присутність вуглеводів, але й наявність у певному положенні  $\alpha$ -спіралі або  $\alpha$ -нитки амінокислоти проліну є основними факторами забезпечення високої термостабільності глюкозидаз [5, 8]. Методом спрямованого сайт-мутагенезу на прикладі

$\alpha$ -глюкозидаз *Saccharomyces cerevisiae* виявлено, що Val216 є важливим залишком, який визначає специфічність цих ензимів щодо типу зв'язку ( $\alpha$ -1,4 або  $\alpha$ -1,6) [9]. Для ензиму з *Geobacillus* sp. було показано, що Asp98 разом з Asp199, Asp326 та Glu256 є необхідними для вияву ензимної активності [10].

### Властивості мікробних $\alpha$ -глюкозидаз

На сьогодні  $\alpha$ -глюкозидази різної специфічності знайдено у багатьох мікроорганізмів. Більшість із них одержано в гомогенному стані (табл. 2), детально вивчено їхні властивості. Однак в останні роки дедалі більшу увагу приділяють дослідженню властивостей  $\alpha$ -глюкозидаз із архебактерій — гіпертермофілів — *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus* sp., *Thermotoga maritima*, які виявляють свою активність при температурі понад 100 °С.

Екстрацелюлярну  $\alpha$ -глюкозидазу було отримано з термофільної архебактерії *Thermococcus* sp. [11]. Ензим має мономерну структуру з молекулярною масою 60 кДа, рН 5,0. При 98 °С ензим втрачає половину активності за 35 хв, однак цей час зростає до

215 хв за присутності 1% дитіотреїтолу та 1% бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Застосування різних методів, включаючи іммобілізацію, хімічну модифікацію і додавання стабілізуючих сполук (БСА, солі та ін.) дозволило авторам досягти стабільності ензиму при температурі понад 100 °С. Така  $\alpha$ -глюкозидаза зберігає 50% активності при 130 °С через 30–60 хв інкубації за присутності 90% сорбітолу, 1% дитіотреїтолу та 1% БСА.

Дослідження гіпертермофільних морських архебактерій привертає особливу увагу дослідників, оскільки окрім еволюційного значення ензима із цих мікроорганізмів дають можливість вивчати структуру та функціонування протеїнів в умовах високих температур. Такі ензими мають високий біотехнологічний потенціал для переважного використання їх у технологічних схемах. До таких організмів належать представники роду *Pyrococcus*, а саме *P. furiosus* та *P. Brockii*.

Гіпертермофільна архебактерія *P. furiosus*, оптимальна температура для вирощування якої становить 100 °С, продукує комплекс амілолітичних ензимів, включаючи й внутрішньоклітинну  $\alpha$ -глюкозидазу [12].

Таблиця 2. Способи очищення  $\alpha$ -глюкозидаз із мікробних джерел

Джерело ензиму	Етапи очищення	Вихід, %
<i>Thermococcus</i> sp [11]	Гель-фільтрація на HiLoad Q-Sepharose, феніл-Sepharose, НРНТ-гідроксилапатиті та хроматографія на Mono Q	4 (очищення у 875 разів)
<i>Pyrococcus furiosus</i> [12]	Фракціонування сульфатом амонію (30–70%), іонобмінна хроматографія на DEAE-целюлозі, хроматографія на гідроксилапатиті та гель-фільтрація на Sephadex G-200	8,5 (очищення в 310 разів)
<i>Torulaspora pretoriensis</i> [19]	Хроматографія на Toyopearl HW 55F, DEAE-Toyopearl 650M, гідроксилапатиті та феніл-Toyopearl 650M, препаративний електрофорез	очищення у 103 рази
<i>Rhizobium</i> sp. [22]	Осадження сульфатом амонію, катіон-обмінна хроматографія на DEAE-TrisAcryl M, гідрофобна хроматографія на феніл-Sepharose та гель-фільтрація на Ultrogel AcA 44	18 (очищення в 475 разів)
<i>Mortierella alliacea</i> [21]	Осадження етанолом, гідрофобна хроматографія на HiLoad Phenyl Sepharose, катіонообмінна хроматографія на Resours S, рехроматографія на Resours S, гель-фільтрація на HiLoad Superdex 200	2,3 (очищення в 33 рази)
<i>Bacillus thermoamyloliquefaciens</i> [17]	Фракціонування сульфатом амонію (40-70%), іонобмінна хроматографія на DEAE-Sephadex A50, рехроматографія на DEAE-Sephadex A50, хроматографія на Bio-Gel НТР, гель-фільтрація на Sepharose CL-6B	10 (очищення в 68 разів)
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> [26]	Осадження сульфатом амонію(100%), іонообмінна хроматографія на DEAE-Sepharose CL-6B, хроматографія на Bio-Gel 3-200	86 (очищення в 16 разів)
<i>Picrophilus torridus</i> [14]	Одержання клітинних екстрактів, теплова обробка (15 хв при 67 °С), іонообмінна хроматографія на Source Q, гель-фільтрація на Superdex 200	9,4 (очищення в 39 разів)

Вона має молекулярну масу 125 кДа (за даними ЕФ у SDS-ПААГ), оптимум активності досягається за рН 5,0–6,0 та температури 105–115 °С. Ензим термостабільний при 98 °С протягом 48 год (50% активності).

За будовою молекули бактеріальні  $\alpha$ -глюкозидази найчастіше мають мономерну структуру, хоча є дані щодо пентамерної структури  $\alpha$ -глюкозидази *Sulfolobus solfataricus* з молекулярною масою 400 кДа, яка виявляє активність щодо  $\alpha$ -1,4-зв'язків мальтоолігосахаридів та  $\alpha$ -1,6-зв'язків ізомальтози [13]. Ензим має високу термостабільність: максимальну активність виявляє при 105 °С, зберігає половину активності упродовж 11 год при 85 °С, 3 год — при 95 °С та 2,75 год при 100 °С. Ця  $\alpha$ -глюкозидаза надзвичайно стійка до протеолізу та дії денатуруючих агентів, включаючи аліфатичні спирти.

*Picrophilus torridus* — екстремофільний організм, що належить до родини еуархеїв, в останні роки привернув увагу дослідників своєю здатністю виживати в дуже кислих умовах середовища, навіть при значеннях рН, близьких до 0. Уперше штами цього виду було ізольовано в зоні сухих сольфатарових полей Північної Японії. В умовах геотермального підігріву кислотність зумовлена наявністю сірчаної кислоти, яка утворюється шляхом окиснення вулканічної сірки до SO<sub>3</sub> та реакції останньої з водою. Поряд із цим концентрація кислоти може зростати під впливом випаровування. *P. torridus*, виділений з такої еконіші, має відповідні властивості: оптимальними для росту є температура 60 °С та рН 0,7 [14]. Особливістю штамів цього виду є нездатність їх рости при рН, більших за 4,0, а також низькі значення рН цитоплазми (4,6), що суттєво відрізняє їх від інших термоацидофільних мікроорганізмів, які підтримують внутрішньоклітинне рН на рівні нейтральних значень.

Внутрішньоклітинний ензим з *P. torridus* було отримано в гомогенному стані (табл. 2); за даними ЕФ у SDS-ПААГ, його молекулярна маса становила 74,5 кДа, але активна форма ензиму має гексамерну будову та молекулярну масу 440 кДа. Максимальну активність він виявляє при 87 °С, рН 5,0 (субстрат 4-НФ- $\alpha$ -глюкозид), а за оптимальної температури вирощування — 60 °С — тільки 23% від максимальної активності. Після інкубації при 80 °С протягом 120 хв ензим зберігає понад 80% активності.  $\alpha$ -Глюкозидаза *P. torridus* активна в досить широкому діапазоні рН з максимумом при 5,0.

Філогенетичний аналіз  $\alpha$ -глюкозидазних кластерів *P. torridus* показав більшу подібність з віддаленим родом *Sulfolobus*, ніж з близькоспорідним *Thermoplasma*. Висунуто гіпотезу про те, що між цими двома родами відбувалася широка латеральна передача генів. Тому не дивно, що  $\alpha$ -глюкозидазі *P. torridus* притаманні властивості, подібні до тих, що їх раніше було встановлено для її гомолога — мальтази *S. solfataricus* [15]. Було б цікаво також вивчити досі не охарактеризовані гомологи  $\alpha$ -глюкозидази *P. torridus*, які знайдено в інших еуархеїв, таких як *T. acidophilum* та *T. volcanium* (САС11443 та ВАВ60467 відповідно). Можливо,  $\alpha$ -глюкозидаза *P. torridus* відіграє важливу роль в утилізації  $\alpha$ -глюкоанів типу крохмалю та мальтоолігосахаридів.

Великий інтерес становить виділення  $\alpha$ -глюкозидази з ацидофільної бактерії *Ferroplasma acidiphilum* [16]. Для цього організму характерним є ріст за дуже низьких значень рН — усього 1,7, а рН-оптимум виділеного ензиму — в діапазоні 1,7–4,0, що нижче від показників рН цитоплазми клітини. На думку авторів, це може свідчити про наявність не виявлених клітинних механізмів, які забезпечують розділення у цитоплазмі зон з різним значенням рН, так звану «плямистість» цитоплазми. Утім, це питання ще потребує детальних досліджень.

Відрізняється від багатьох бактеріальних ензимів  $\alpha$ -глюкозидаза термофільної бактерії *Bacillus thermoamyloliquefaciens* КР1071 [17]. Цей ензим є термофільним, термостабільним та надзвичайно стійким до дії денатуруючих агентів. Встановлено, що його молекула не містить вуглеводів, а за своєю будовою є гексамером з молекулярною масою 540 кДа. Ізоелектрична точка — при 5,7. Проведений N-термінальний сіквенс 20 амінокислотних залишків (Ala1-Ile-Gln-Pro-Glu-Gln-Asp-Asp-Lys-Thr-Gln-Glu-Asp-Gly-Tyr-Ile-Asp-Ile-Gly-Asn20) не виявив гомології з жодним прокаріотичним або еукаріотичним протеїном, включаючи мономерні екзо- $\alpha$ -1,4-глюкозидази та оліго-1,6-глюкозидази мікроорганізмів. Найбільшу активність ензим виявляє при 81 °С та рН 7,0, однак за цих умов втрачає половину активності протягом 10 хв. У присутності 6,4 М сечовини, 26% етанолу або 2,5% SDS «період напівжиття» цього ензиму становить 5 год при 55 °С. Автори вважають, що висока стабільність  $\alpha$ -глюкозидази є результатом комбінування ефекту олігомеризації зі збільшеною стабільністю субодиниць молекули ензиму, порівняно з мономерними



протеїнами, оскільки субодинична агрегація супроводжується збільшенням гідрофобних взаємодій. У  $\alpha$ -глюкозидази *B. thermoamyloliquefaciens* КР1071 виявлено значну кількість гідрофобних амінокислот (62,3 моль/моль), а відомо, що саме гідрофобні зв'язки забезпечують термостабільність ензимів, оскільки водневі та іонообмінні взаємодії значно послаблюються з підвищенням температури. Висока термотолерантність олігомерних  $\alpha$ -глюкозидаз *S. solfataricus* та *B. thermoamyloliquefaciens* КР1071 схиляє до думки, що олігомеризація є одним із можливих шляхів захисту молекул ензимів від температурного стресу.

Виділено  $\alpha$ -глюкозидази і з морських гліководних бактерій роду *Geobacillus*. Молекулярна маса  $\alpha$ -глюкозидази з *Geobacillus* sp., за даними ЕФ у SDS-ПААГ, дорівнює 65 кДа, однак в умовах слабкої іонної сили ензим набуває вигляду димеру (130 кДа). Він є термостабільним та стійким у лужних умовах, період «напівжиття» при 60 °С та рН 9,0 у 15 мМ гліцин-NaOH буфері — понад 13 год [10].

Іншу  $\alpha$ -глюкозидазу з *G. thermodenitrificans* було очищено у 25 разів з виходом 32% [18]. Молекулярна маса її, за даними ЕФ у SDS-ПААГ, становила 45 кДа. Однак цей ензим є менш термостабільним, оптимальними для вияву активності для нього були показники рН у діапазоні 6,5–7,5 та температура 55 °С. Виявляє синергічну дію з  $\alpha$ -амілазою, що також синтезується цією культурою, але зовсім не має трансглюкозилюючих властивостей.

Молекулярна маса іншої  $\alpha$ -глюкозидази, виділеної з *Torulaspora pretoriensis* [19], за даними ЕФ у SDS-ПААГ, досягала 69 кДа, а за даними гель-фільтрації — 60 кДа. Оптимуми рН та температури — при 6,8 та 35 °С відповідно.

Окрім бактеріальних продуцентів  $\alpha$ -глюкозидаз, в останні роки активно ведуться дослідження активних грибних та дріжджових біосинтетиків. Перспективним термофільним продуцентом є гриб *Thermoascus aurantiacus* [20]. Термооптимум  $\alpha$ -глюкозидази, виділеної з нього, досягається при 70 °С, ензим зберігає 100% активності через 10 год при 60 °С, але на 50% інактивується за 15 хв при 80 °С. До того ж він стабільний у широкому діапазоні рН.

Охарактеризовано ще одну нову  $\alpha$ -глюкозидазу з *Mortierella alliacea* [21]. Молекула цього ензиму складається з двох різних за масою субодиниць — 61 та 31 кДа, які не зв'язані між собою ковалентними зв'язка-

ми, але стабільно агрегуються за високих концентрацій солей (0,5 М). У процесі гель-фільтрації спостерігається вихід одного протеїну з молекулярною масою 92 кДа, що також підтверджує гетеродимерну будову молекули ензиму. Автори вважають, що він утворюється у вигляді одного поліпептиду, який потім піддається обмеженому протеолізу. Є попередні дані, які свідчать про те, що 2 субодиниці  $\alpha$ -глюкозидази *M. alliacea* кодуються одним геном. Оптимальними умовами для гідролізу мальтози є рН 5,0 — 6,0 та температура 55 °С. Для трансглюкозилюючої активності у присутності етанолу під час утворення етил- $\alpha$ -глюкозиду оптимальними є рН 5,0 і температура 45–50 °С. Ензим стабільний у діапазоні рН від 4,0 до 10,0 протягом 24 год. Після 15-хвилинної інкубації при 60 °С реєструється 80% від вихідної активності.

Досить добре на цей час вивчено  $\alpha$ -глюкозидазу *Rhizobium* sp. Це мономерний неглікозильований протеїн з молекулярною масою 59±0,5 кДа, рН 4,75 [22]. Ензим стабільний при -20 °С упродовж декількох місяців, ліофілізація суттєво не впливає на його активність. Оптимальними умовами для вияву активності є рН 6,0 — 6,5 і температура 35 °С. Показано, що активність ензиму зростала у присутності  $\text{NH}_4^+$  та  $\text{K}^+$ -іонів (10 мМ). Проте його активність інгібується іонами міді, срібла, ртуті та заліза (II), а також різними похідними фенолу, фенолу та флавоноїдів.

$\alpha$ -Глюкозидаза, виділена з культуральної рідини *Acremonium implicatum*, являє собою тетрамерний протеїн (мол. маса 440 кДа), мономери якого (мол. маса 103 кДа) складаються з двох поліпептидів (мол. маса 51 та 60 кДа), що утворюються, ймовірно, в результаті посттрансляційного протеолізу [23].

Було отримано в очищеному вигляді  $\alpha$ -глюкозидазу з *Candida albicans* [24], молекула якої, за даними ЕФ у SDS-ПААГ, мала у своєму складі поліпептиди (36 та 47 кДа).

Також досліджено іншу дріжджову  $\alpha$ -глюкозидазу, виділену з *Xanthophyllomyces dendrorhous* [25]. Її молекулярна маса, за даними ЕФ у SDS-ПААГ, становить 60,2 кДа, а за даними гель-фільтрації — 115 кДа. Ця глюкозидаза є глікопротеїном, а тому частка вуглеводів досягає 12% від маси молекули. Ензим не належить до найбільш термотолерантних, його термооптимум — при 45 °С, а при 50 °С він втрачає половину активності за 3 год.

$\alpha$ -Глюкозидаза з *Schwanniomyces occidentalis* мала рН-оптимум у діапазоні

3,5–5,0 і була стабільною в діапазоні 3,0–9,0 [26]. Однак цей ензим виявляє низьку термостабільність і при 60 °C втрачає активність за 15 хв.

### Умови культивування

На прикладі вирощування культури *S. solfataricus* показано, що активними індукторами синтезу  $\alpha$ -глюкозидази можуть бути ізопропіловий ефір  $\alpha$ -D-тіогалактопіранозиду або лактоза [27]. Індукція синтезу ензиму також відбувається з додаванням у живильне середовище дріжджового субстрату та триптонну. В умовах біореактора з ультрафільтраційними мембранами при концентрації клітин 50 г сух. маси/л одержували продукцію  $\alpha$ -глюкозидази на рівні 11,5 тис. Од/л. Комбінація генно-інженерних та мікрофільтраційних технологій дозволяє підвищити вихід ензимів у 2 тис. разів.

Для глибинної культури *T. aurantiacus* встановлено, що максимальний рівень активності — 30 Од/мл — досягається на 336-й год вирощування. Індукторами в цьому разі були пшеничні висівки та м'якоть касапи [20].

На прикладі бактерії *P. furiosus*, яку вирощували на середовищі з морською водою, додаючи 10 г S<sup>0</sup>, 5 г триптонну та 1 г дріжджового екстракту (на 1 л), було з'ясовано, що найкращими індукторами синтезу  $\alpha$ -глюкозидази є крохмаль, глікоген та пулулан, а також мальтоза [12]. Оскільки глюкоза не метаболізується *P. furiosus*, то мальтоза або інші продукти гідролізу полісахаридів надходять у клітину в активній або пасивній формі, за допомогою мальтозопермеази, як індуктори синтезу амілолітичних ензимів. Як і в багатьох бактеріальних системах,  $\alpha$ -глюкозидаза *P. furiosus* відіграє роль останньої ланки в гідролізі крохмалю до глюкози.

### Субстратна специфічність $\alpha$ -глюкозидаз

Мікробні  $\alpha$ -глюкозидази мають значні відмінності у субстратній специфічності. До того ж ці ензими можуть бути екстрацелюлярними, внутрішньоклітинними або зв'язаними з мембраною. Таким чином, класифікація та порівняння ензимів з різних джерел вкрай ускладнюються.  $\alpha$ -Глюкозидази, виділені з тваринних, рослинних та грибних джерел, зазвичай виявляють вищу активність щодо мальтоолігосахаридів, ніж до сахарози чи амілоглюкозидів. Зокрема, грибні ензими гідролізують переважно коротколанцюгові вуглеводні субстрати. Так,

$\alpha$ -глюкозидаза з *A. oryzae* та *A. niger* надто повільно гідролізує  $\alpha$ -глюкани, однак ензими з *Mucor javanicus*, *M. racemosus*, *Paecilomyces varioti* та *Penicillium* spp. здатні деякою мірою деградувати розчинний крохмаль. Така специфічність відрізняє ці ензими від інших екзоглюкозидаз, таких як грибні глюकोамілази.

Дані щодо гідролітичної активності  $\alpha$ -глюкозидази *M. alliacea* [21] наведено у табл. 3. Гомогенні субстрати, такі як мальтоза або крохмаль, гідролізуються нею краще, ніж гетерогенні, зокрема сахароза або 4-нітрофеніл-глюкозид. Ензим найкраще атакує  $\alpha$ -1,4-зв'язок, меншою мірою  $\alpha$ -1,2 і майже не розщеплює  $\alpha$ -1,6-зв'язок. Але найцікавішим є те, що розчинний крохмаль розщеплюється ефективніше, ніж мальтоза. Загалом, характерною особливістю  $\alpha$ -глюкозидази з *M. alliacea* є те, що полісахариди гідролізуються нею значно краще, ніж олігосахариди. На основі вивчення ефективності гідролізу мальтоолігосахаридів з різною довжиною ланцюга було встановлено, що найбільшу афінність ензим має до мальтотетрози ( $k_{cat}/K_m = 23,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), а найбільшу афінність до субстрату — субсайт зв'язування 2 ( $4,91 k_{cal}/\text{mol}$ ), далі йде субсайт 1 ( $0,98 k_{cal}/\text{mol}$ ), а потім — 3 ( $0,16 k_{cal}/\text{mol}$ ). Такий розподіл також свідчить про те, що йдеться саме про  $\alpha$ -глюкозидазу, а не про глюкоамілазу. Ще одним доказом того, що виділений ензим належить до  $\alpha$ -глюкозидаз, є наявність у нього трансглюкозилуючої активності (табл. 3). Причому тут також показано перевагу розчинного крохмалю та глікогену перед мальтозою для перенесення глюкозного залишка на молекулу етанолу.

Подібну до ензиму з *M. alliacea* високу специфічність щодо мальтоолігосахаридів (розчинного крохмалю зокрема) має й  $\alpha$ -глюкозидаза, яку виділено з культури *S. occidentalis* (табл. 4) [26]. Ензим виявляє дуже високу каталітичну ефективність щодо крохмалю ( $k_{cat}/K_m$ ), тому його спочатку ідентифікували як глюкоамілазу. Однак у результаті дослідження аномерної конфігурації продуктів гідролізу та нуклеотидного сиквенсу цей ензим було остаточно віднесено до  $\alpha$ -глюкозидаз (ЕС 3.2.1.20).

Нова  $\alpha$ -глюкозидаза дріжджового гриба *Xanthophyllomyces dendrorhous* також має високі показники каталітичної ефективності [ $k_{cat}/K_m$ , (хв<sup>-1</sup>·мМ<sup>-1</sup>)] щодо мальтоолігосахаридів: 873 — для мальтотріози, 698 — для мальтогептози. Цей ензим гідролізує розчинний крохмаль, але у 3,5 та 1,4 раза повільніше, ніж мальтотріозу та мальтозу

Таблиця 3. Субстратна специфічність  $\alpha$ -глюкозидази *M. alliacea* [21]

Субстрат	Гідроліз, мкМ глюкози/мг протеїну/хв	Утворення етил $\alpha$ -глюкозидів, мг $\alpha$ -ЕГ/мг протеїну/хв
Мальтоза ( $\alpha$ -1,4)	29,8 $\pm$ 1,7	0,91 $\pm$ 0,05
Трегалоза ( $\alpha,\alpha$ -1,1)	0,3 $\pm$ 0,1	нв
Ізомальтоза ( $\alpha$ -1,6)	1,0 $\pm$ 0,1	нв
Малтитол	5,3 $\pm$ 0,1	0,06 $\pm$ 0,01
Амілоза ( $\alpha$ -1,4)	8,3 $\pm$ 0,4	—
Койобіоза ( $\alpha$ -1,2)	7,0 $\pm$ 0,3	0,16 $\pm$ 0,03
Етил $\alpha$ -глюкозид	0,3 $\pm$ 0,1	—
Нігероза ( $\alpha$ -1,2)	26,1 $\pm$ 0,7	0,28 $\pm$ 0,04
Сахароза ( $\alpha$ -1, $\alpha$ -2)	0,9 $\pm$ 0,1	нв
Розчинний крохмаль	42,9 $\pm$ 5,2	1,19 $\pm$ 0,08
Глікоген ( $\alpha$ -1,4)	30,2 $\pm$ 2,9	1,56 $\pm$ 0,06
Амілопектин ( $\alpha$ -1,4)	34,3 $\pm$ 1,9	—
Декстран ( $\alpha$ -1,6)	0,2 $\pm$ 0,1	нв
Пулулан ( $\alpha$ -1,6)	0,9 $\pm$ 0,1	нв
4-НФ-глюкозид	3,4 $\pm$ 0,2	0,02 $\pm$ 0,01

Примітка: нв — не визначалась (менше ніж 0,0005 мг  $\alpha$ -ЕГ/мг протеїну/хв).

Таблиця 4. Кінетичні характеристики  $\alpha$ -глюкозидази *S. occidentalis* [26]

Субстрат	$k_{cat}$ , $c^{-1}$	$K_m$ , мМ	$k_{cat}/K_m$ , $c^{-1} \cdot mM^{-1}$
Мальтоза	190	0,096	2,000
Мальтотріоза	230	0,064	3,590
Мальтотетроза	180	0,051	3,500
Мальтопентоза	200	0,087	2,300
Мальтогексоза	140	0,078	1,800
Мальтогептоза	140	0,11	1,270
Розчинний крохмаль	140	0,66	210
4-нітрофеніл- $\alpha$ -глюкозид	8,0	0,48	16,7
4-нітрофеніл- $\alpha$ -мальтозид	260	0,12	2,170
Койобіоза	33	0,61	54,1
Нігероза	59	3,0	19,7
Ізомальтоза	130	1,6	81,2

відповідно, та зовсім не діє на сахарозу, аріл- $\alpha$ -глюкозидази або ізомальтоолігосахариди. За своєю специфічністю він є  $\alpha$ -глюкозидазою типу II [4].

$\alpha$ -Глюкозидаза *Rhizobium* sp. не відщеплює глюкозу від метил- $\alpha$ -глюкозиду, мальтотріози, мальтотетрози, мальтопентози, мальтогексози, мальтогептози, мальтозо-1-фосфату, туранози, малтитолу мальтотриїтолу, ізомальтози, ізомальтитолу, панози, крохмалю, амілопектину,  $\alpha$ -циклодекстрину, декстрану, пулулану, целобіози, целюлози, лактози. За своєю специфічністю цей ензим є типовою  $\alpha$ -глюкозидазою і може бути використаний як специфічний агент щодо ароматичних сполук рослин, таких як феніл-глікозидази, флавоноїди та гормони [22].

Для термофільного гриба *T. aurantiacus* характерним є синтез  $\alpha$ -глюкозидази, яка переважно гідролізує мальтозу й дуже повільно крохмаль, декстрини, синтетичні субстрати (4-нітрофеніл- $\alpha$ -глюкозид) і зовсім не гідролізує сахарозу. Тобто, за своїми властивостями вона є  $\alpha$ -глюкозидазою типу II [20].

Дослідження широкого спектра оліго-, полісахаридів та синтетичних глікозидів показало, що  $\alpha$ -глюкозидаза термоацидофільного мікроорганізму *P. torridus* найефективніше гідролізувала мальтозу та *p*-нітрофеніл-глюкозид [14]. Від синтетичних субстратів ензим відщеплює виключно глюкозу та виявляє строгу специфічність щодо типу зв'язку (тільки  $\alpha$ -1,4). Швидкість гідролізу мальтоолігосахаридів зменшувалася

зі збільшенням кількості молекул мальтози в субстраті. Активність щодо мальтотетрози становила 54, а щодо декстрину 10 — усього 27% від активності в разі використання мальтози. На відміну від близького гомолога із *S. solfataricus* або  $\alpha$ -глюкозидази ссавців, ця глюкозидаза не здатна відщеплювати глюкозу від полімерних субстратів типу глікогену. Аналіз продуктів гідролізу мальтоолігосахаридів методом тонкошарової хроматографії показав відсутність будь-якої трансферазної активності в  $\alpha$ -глюкозидази *P. torridus* [14].

Для  $\alpha$ -галактозидази *A. niger*, яка одноково швидко гідролізує як глюко-, так і ксиліпіранозиди від синтетичних субстратів, було встановлено, що зв'язування ізомальтози та ксиліпіранозид  $\alpha$ -1,6-глюкопіранозиду відбувається на одному й тому самому сайті зв'язування [28].

Аналіз субстратної специфічності  $\alpha$ -глюкозидази *B. thermoamyloliquefaciens* KP1071 [17] свідчить, що ензим виявляє як оліго-1,6-глюкозидазну, так і екзо- $\alpha$ -1,4-глюкозидазну активність, але переважає гідроліз  $\alpha$ -1,4-глюкозидних зв'язків з нередукуючого кінця субстрату. Активність щодо пулулану та декстрану не перевищувала гідролізу 1% субстрату за 2 год. Найбільшу афінність ензим виявляє до мальтози, мальтотріози, мальтотетрози та мальтопентози, дещо меншу — щодо декстрину та амілози А. Було з'ясовано, що в разі використання як субстратів 4-нітрофеніл-глюкозиду, мальтози та ізомальтози, Трис є конкурентним інгібітором каталітичної реакції.

Інша термофільна  $\alpha$ -глюкозидаза *S. solfataricus* гідролізує переважно субстрати, де глюкоза поєднана  $\alpha$ -1,4-зв'язком у такому порядку: мальтоза > мальтотріоза > мальтотетроза > мальтогептоза > 4-НФ- $\alpha$ -глюкозид (але зовсім не відщеплює від синтетичного субстрату  $\alpha$ -глюкозид). Їй не притаманна здатність розщеплювати крохмаль та декстрини. Дуже повільно гідролізує ізомальтозу, але не декстрини, що свідчить про здатність ензиму розщеплювати  $\alpha$ -1,6-зв'язок, однак лише в коротких ланцюгах. Показано, що активність цієї  $\alpha$ -глюкозидази щодо мальтози можна значно підвищити *n*-пропанолом або етанолом: до 50% — з використанням 50%-го пропанолу та 20%-го етанолу, а при 85 °С присутність 7,5%-го *n*-пропанолу підвищує показники  $K_m$  та  $V_{max}$  для мальтози в 3 рази.

Було виявлено надзвичайно високу трансглюкозилуючу активність ензиму з *Geobacillus* sp. [10]. Ця  $\alpha$ -глюкозидаза мала

здатність гліколізувати різні неуглеводні молекули, використовуючи мальтозу як донора. Така властивість дозволяє застосовувати ензим для біосинтезу різних складних вуглеводів.

Цікавими є результати, що їх одержано для рекомбінантної  $\alpha$ -глюкозидази (*Pichia pastoris*) із ячменю. Цей ензим гідролізував мальтозу в 3 рази швидше, ніж нігерозу, та в 20 разів швидше, ніж трегалозу та ізомальтозу. Уперше на цьому ензимі було показано можливість субстратного інгібування  $\alpha$ -глюкозидази, оскільки мальтоза в концентрації вище за 20 мМ була інгібітором гідролізу мальтози [29].

$\alpha$ -Глюкозидаза *C. albicans* переважно гідролізувала нігерозу, де глюкоза зв'язана  $\alpha$ -1,3-зв'язком [24]. Також очищений ензим конвертував олігосахарид GlcMan9GlcNAc2 до Man9GlcNAc2. Ці та інші властивості дозволяють залучати цю  $\alpha$ -глюкозидазу до оброблення N-гліканів.

Ще одну високоспецифічну до  $\alpha$ -1,3-зв'язку  $\alpha$ -глюкозидазу було виділено з *A. implicatum* [23]. Нігероза та мальтоза гідролізуються цим ензимом швидко, проте повільніше, ніж койобіоза. Ізомальтоза гідролізується дуже повільно, а сахароза не розщеплюється взагалі. Найбільшу афінність він виявляє до мальтоолігосахаридів та 4-нітрофеніл- $\alpha$ -мальтозиду, добре гідролізує розчинний крохмаль. Ця глюкозидаза має  $\alpha$ -1,3- та  $\alpha$ -1,4-глюкозилтрансферазну активність і може синтезувати олігосахариди, але їй не притаманна здатність утворювати  $\alpha$ -1,2- та  $\alpha$ -1,6-глюкозидні зв'язки. Слід наголосити, що її здатність формувати  $\alpha$ -1,3-глюкозидні зв'язки в 2–3 рази вища, ніж здатність утворювати  $\alpha$ -1,4-зв'язки. За допомогою трансглюкозилуючої активності цього ензиму вдалось отримати дві нові сполуки: 3(2)-O- $\alpha$ -нігерозил-мальтозу та 3(2)-O- $\alpha$ -мальтозил-мальтозу.

Глюкозидаза *T. pretoriensis* має найбільшу спорідненість до синтетичного нітрофенільного субстрату, а найменшу — до мальтози [19].  $K_m$  (мМ) для 4-нітрофеніл- $\alpha$ -глюкозиду, мальтози, мальтотріози, ізомальтози, метил- $\alpha$ -глюкозиду та сахарози становлять 0,15, 150, 45, 17, 18 та 29, а  $V_{max}$  (мМ/хв/мг протеїну) для тих самих субстратів — 87; 0,23; 2,4; 9,0; 12; 7,4 відповідно. Ензим піддавався інгібуванню  $AgNO_3$ ,  $HgCl_2$ , SDS та N-етилмалеїмідом. За своїми властивостями він близький до  $\alpha$ -глюкозидази із *S. cerevisiae*.

Субстратні пріоритети  $\alpha$ -глюкозидази *Thermococcus* sp. можна розташувати в такому



порядку: 4-НФ- $\alpha$ -D-глюкозид > нігероза > паноза > палатіноза > ізомальтоза > мальтоза й тураноза [11].  $K_m$  при 70 °C для 4-нітрофеніл- $\alpha$ -D-глюкозиду дорівнює 0,41 мМ. Проте ензим був зовсім не здатний гідролізувати крохмаль, пулулан, амілозу, мальтотріозу, мальтотетрозу, ізомальтотріозу, целобіозу та  $\alpha$ -гентіобіозу. Було встановлено, що дитіотреїтол (1%) та БСА (0,4%) значною мірою підвищували активність  $\alpha$ -глюкозидази.

Термостабільна  $\alpha$ -глюкозидаза *P. furiosus* [12] виявляє активність щодо 4-НФ-глюкозиду й не атакує крохмаль і сахарозу. Було показано, що мальтоза виступає інгібітором  $\alpha$ -глюкозидазної активності в разі використання 4-нітрофеніл-глюкозиду як субстрату ( $K_i = 14,3$  мМ). Преінкубація з 1% SDS або 1,0 М гуанідин-НСІ суттєво знижує активність ензиму, тимчасом як 30-хвилинна преінкубація з 100 мМ дитіотреїтолом або 1 М сечовиною при 98 °C майже не впливала на його активність. Надзвичайно висока термостабільність та стійкість до дії денатуруючих агентів свідчать про наявність унікальних, ще не розкритих властивостей у цієї  $\alpha$ -глюкозидази, виявлення яких є вкрай важливим.

Завдяки широкому спектру різноманітних каталітичних властивостей  $\alpha$ -глюкозидази використовують у різних технологічних процесах. Трансглікозилуючі реакції у присутності етанолу дозволяють отримувати етил- $\alpha$ -глюкозид, підсолоджуючу та ароматизуючу речовину, що запобігає утворенню карієсу й підсилює бар'єрний ефект шкіри. Зазвичай цю речовину одержують за допомогою мальтози як донора глікозильних залишків, однак використання у цих процесах  $\alpha$ -глюкозидаз, високоспецифічних щодо крохмалю та глікогену, уможливить одержання етил- $\alpha$ -глюкозидів із полісахаридів.

### Каталітичний механізм $\alpha$ -глюкозидаз

$\alpha$ -Глюкозидази каталізують реакції двох типів — перенесення глікозного залишку з невідновлювального кінця олігосахариду на воду (гідроліз) або перенесення цього залишку на молекулу акцептора (трансглікозилювання). Ці реакції з формального погляду є нуклеофільним заміщенням у насиченому вуглеці  $C_1$  аномерного центру і можуть відбуватись як зі збереженням, так й з інверсією аномерної конфігурації продукту. Відповідно розглядають два типи ензимів, що переносять глікозил, — «зберігаючі» та

«інвертуючі».  $\alpha$ -Глюкозидази належать до першого типу, а глюкоамілази — до другого (рис. 1).

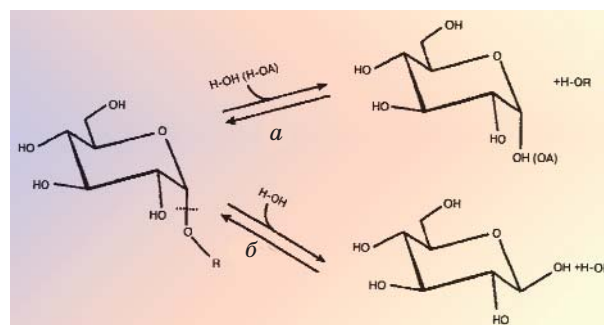


Рис. 1. Процеси гідролізу та трансглікозилювання під дією  $\alpha$ -глюкозидази (а) та глюкоамілази (б) [4]

Особливе значення у встановленні тонких механізмів дії глікозидаз (особливо  $\alpha$ -глюкозидаз) мають роботи Nehre [30], Liu et al. [31] та Lehmann et al. [32], присвячені вивченню взаємодії цих ензимів із субстратами, в яких  $C_1$  перебуває або в подвійному зв'язку (глікалі, глікогептенітоли, глікооктенітоли), або ж аномерна конфігурація «неправильна», як у  $\beta$ -D-глюкозилфториду. Було встановлено, що  $\alpha$ -глюкозидази реагують із вищезазначеними субстратами, зв'язуючись з ними продуктивно, ймовірно внаслідок відсутності у них громіздких замісників при  $C_1$  з «неправильною» орієнтацією. Показано, що глюкозидази гідролізують усі ці субстрати, тоді як жодна  $\alpha$ -глюкозидаза не реагує з найменшим «неправильним» глюकोзидом — метил- $\beta$ -D-глюкопіранозидом, можливо через те, що на екваторіальний замісник при  $C_1$  накладено конформаційні обмеження амінокислотними залишками, що визначають порожнину активного центру.

Відомо, що  $\alpha$ -глюкозидази швидко гідролізують  $\alpha$ -глюкозилфторид з утворенням  $\alpha$ -глюкози.  $\beta$ -Глюкозилфторид, хоча й значно повільніше, але також гідролізується цими ензимами з утворенням  $\alpha$ -глюкози. Прохіральні субстрати (глюкаль, енітоли) під час гідролізу утворюють  $\alpha$ -аномерні продукти (2-дезоксид- $\alpha$ -глюкозу,  $\alpha$ -глюкогептулозу,  $\alpha$ -глюкооктулозу). Matsui et al. [33] запропонував мінімальну схему (рис. 2), що може пояснити ці ефекти із загальних позицій.

Припускають, що в кожному випадку неподілена пара електронів кисню кільця субстрату бере участь у розщепленні глікозидного зв'язку при  $C_1$  з утворенням загального перехідного стану зі структурою карбокатіону. Принциповим у схемі є положення,

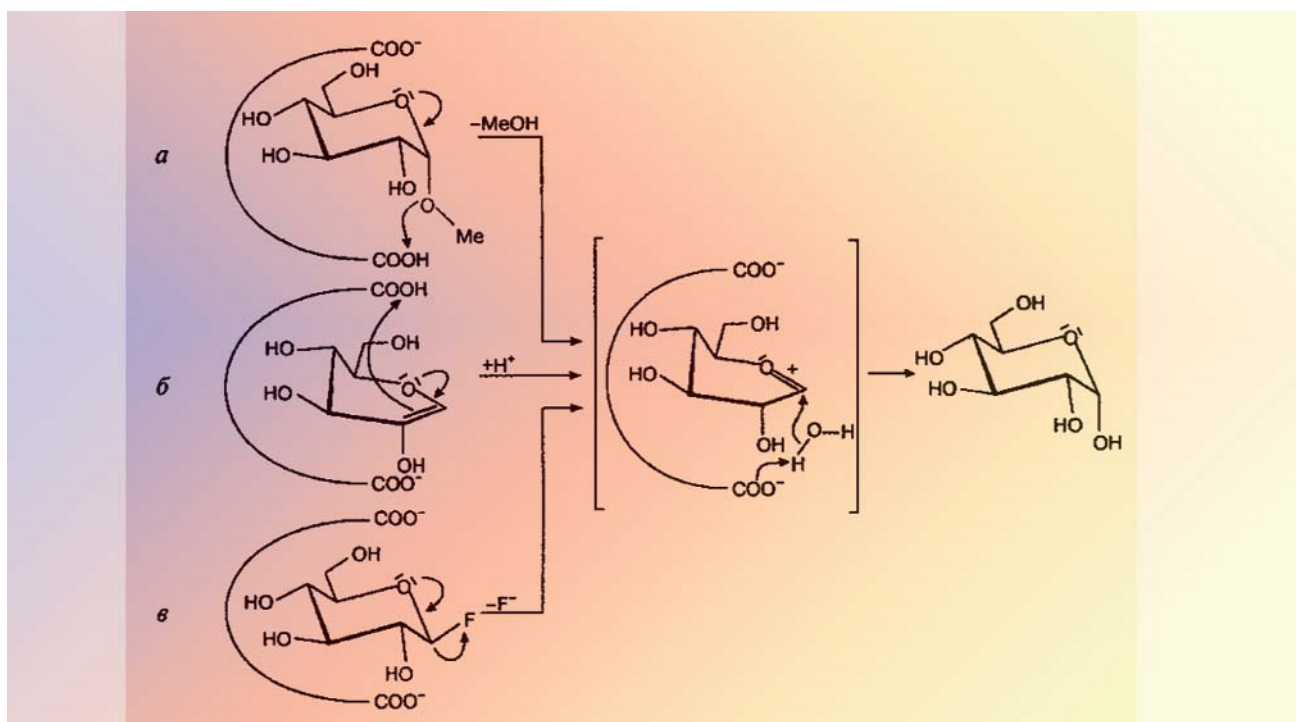


Рис. 2. Можливі механізми гідролізу субстратів з різною аномерною конфігурацією  $\alpha$ -глюкозидазою. Зліва — пластична фаза реакції, справа — консервативна [33]

що для випадків *a* та *б* протонування каталітичних карбоксилів є оборотним (рис. 2). Це підтверджують ЯМР-експерименти з визначення розташування протона під час  $S_2$  (аксіальне або екваторіальне відносно площини кільця) гідратації глюкалю в  $D_2O$  [1]. Нейге робить висновок, що каталітичний акт для  $\alpha$ -глюкозидаз (й інших глікозидаз) можна розділити на дві фази — пластичну та консервативну. У пластичній фазі залежно від субстрату каталітичні карбоксилі можуть мінятися місцями — нуклеофіл стає загальною кислотою й навпаки. Наприклад, подвійний зв'язок глюкалю поблизу нуклеофіла збільшує його рК та сприяє протонуванню. У консервативній фазі гідратація жорстко контролюється структурою протеїну, незалежно від конфігурації субстрату, і для  $\alpha$ -глюкозидаз завжди відбувається в аксіальній позиції з утворенням  $\alpha$ -аномernih продуктів.

Слід зазначити, що механізми  $\beta$ -глюкозидаз досліджено повніше, ніж  $\alpha$ -глюкозидаз. Ймовірно, це пов'язано передусім з меншими труднощами одержання синтетичних субстратів, що мають  $\beta$ -аномерну конфігурацію.

### Біологічні функції $\alpha$ -глюкозидаз

На сьогодні  $\alpha$ -глюкозидази виявлено в багатьох представників симбіотичних мікроорганізмів, зокрема родини *Rhizobiaceae*. Вважають, що вони присутні на всіх стадіях проникнення мікроорганізму до клітини рослини. Вищі рослини продукують ароматичні сполуки у глікозильованій формі, що має важливе значення для розпізнавання бактерій та проникнення їх у рослину.

Глюкозидази відіграють важливу роль і в деградації клітинної стінки рослин.  $\alpha$ -Глюкозидазу та  $\alpha$ -галактозидазу було виявлено у 45 штамів ризобіальних мікроорганізмів. Целюлолітичну та пектинолітичну активність відзначено в *Rhizobium leguminosarum*. Значну глікозидазну активність мали штами *Bradyrhizobium lupini*.

Таким чином, різні глюкозидази, мальтази, амілази, трегалази та целюлази забезпечують симбіоз та утворення бульбочки на корінцях вищих рослин.

Високу  $\alpha$ -глюкозидазну активність мають також біфідобактерії — представники нормофлори кишечника людини. Така властивість дозволяє швидко ідентифікувати ці бактерії, використовуючи ензиматичні методи [34]. Цілком очевидно, що в даному разі  $\alpha$ -глюкозидаза є необхідною для участі в перетравленні вуглеводів.

Підсумовуючи вищевикладене, слід наголосити, що всебічне дослідження мікробних глюкозидаз, зокрема  $\alpha$ -глюкозидаз, дасть змогу не тільки ширше і з високою ефективністю використовувати їх у біотехнологічних процесах, але й поглибить наші

знання щодо еволюційного походження ензимів, їхньої структури й механізму дії, що в кінцевому підсумку дозволить вирішити одне з головних питань сучасної ензимології — розкрити взаємозв'язок між будовою активного центру ензиму та специфічністю його дії.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Chiba S., Brewer C. F., Okada G., Matsui H., Hehre E. J. Stereochemical studies of D-glucal hydration by alpha-glucosidases and exo-alpha-glucanases: indications of plastic and conserved phases in catalysis by glycosylases // *Biochemistry*. — 1988. — V. 27, N5. — P. 1464–1469.
2. Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities // *Biochem. J.* — 1991. — V. 280, Pt. 2. — P. 309–316.
3. Chiba S. Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 1997. — V. 61, N8. — P. 1233–1239.
4. Красиков В. В., Карелов Д. В., Фирсов Л. М.  $\alpha$ -Глюкозидазы // *Биохимия*. — 2001. — Т. 66, №3. — С. 332–348.
5. Watanabe K., Hata Y., Kizaki H., Katsube Y. et al. The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization // *J. Mol. Biol.* — 1997. — V. 269, N1. — P. 142–153.
6. Suzuki Y., Yonezawa K., Hattori M. et al. Assignment of *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071 alpha-glucosidase I to an exo-alpha-1,4-glucosidase, and its striking similarity to bacillary oligo-1,6-glucosidases in N-terminal sequence and in structural parameters calculated from the amino acid composition // *Eur. J. Biochem.* — 1992. — V. 205, N1. — P. 249–256.
7. Varrot A., Yamamoto H., Sekiguchi J. et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the 6-phospho-alpha-glucosidase from *Bacillus subtilis* // *Acta Cryst. D. Biol. Crystallogr.* — 1999. — V. 55, Pt. 3. — P. 1212–1214.
8. Clark S. E., Henson C. A. The effect of proline insertions on the thermostability of a barley alpha-glucosidase // *Prot. Eng.* — 2002. — V. 15, N1. — P. 29–33.
9. Yamamoto K., Nakayama A., Yamamoto Y. et al. Val216 decides the substrate specificity of alpha-glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* // *Eur. J. Biochem.* — 2004. — V. 271, N16. — P. 3414–3420.
10. Hung V.S., Hatada Y., Goda S. et al. Alpha-glucosidase from a strain of deep-sea *Geobacillus*: a potential enzyme for the biosynthesis of complex carbohydrates // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2005. — V. 68, N6. — P. 757–765.
11. Piller K., Daniel R. M., Petach H. H. Properties and stabilization of an extracellular alpha-glucosidase from the extremely thermophilic archaeobacteria *Thermococcus* strain AN1: enzyme activity at 130 degrees C // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1996. — V. 1292, N1. — P. 197–205.
12. Costantino H. R., Brown S. H., Kelly R. M. Purification and characterization of an alpha-glucosidase from a hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, exhibiting a temperature optimum of 105 to 115 degrees C // *J. Bacteriol.* — 1990. — V. 172, N7. — P. 3654–3660.
13. Rolfsmeier M., Blum P. Purification and characterization of a maltase from the extremely thermophilic crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus* // *Ibid.* — 1995. — V. 177, N2. — P. 482–485.
14. Angelov A., Putyrski M., Liebl W. Molecular and biochemical characterization of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -mannosidase and their clustered genes from the thermoacidophilic archaeon *Picrophilus torridus* // *Ibid.* — 2006. — V. 188, N20. — P. 7123–7131.
15. Rolfsmeier M., Haseltine C., Bini E. et al. Molecular characterization of the alpha-glucosidase gene (*malA*) from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* // *Ibid.* — 1998. — V. 180, N5. — P. 1287–1295.
16. Golyshina O.V., Golyshin P.N., Timmis K.N. et al. The pH optimum anomaly of intracellular enzymes of *Ferroplasma acidiphilum* // *Environ. Microbiol.* — 2006. — V. 8, N3. — P. 416–425.
17. Suzuki Y., Nobiki M., Matsuda M. et al. *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071 alpha-glucosidase II is a thermostable M(r) 540,000 homohexameric alpha-glucosidase with both exo-alpha-1,4-glucosidase and oligo-1,6-glucosidase activities // *Eur. J. Biochem.* — 1997. — V. 245, N1. — P. 129–136.
18. Ezeji T.C., Bahl H. Purification, characterization, and synergistic action of phytate-resistant alpha-amylase and alpha-glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10 // *J. Biotechnol.* — 2006. — V. 125, N1. — P. 27–38.

19. Oda Y., Iwamoto H., Hiromi K. et al. Purification and characterization of alpha-glucosidase from *Torulaspota pretoriensis* YK-1 // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 1993. — V. 57, N11. — P. 1902–1905.
20. Carvalho A. F., Goncalves A. Z., da Silva R. et al. specific short dextrin-hydrolyzing extracellular glucosidase from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* 179-5 // J. Microbiol. — 2006. — V. 44, N3. — P. 276–283.
21. Tanaka Y., Aki T., Hidaka Y. et al. Purification and characterization of a novel fungal alpha-glucosidase from *Mortierella alliacea* with high starch-hydrolytic activity // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2002. — V. 66, N11. — P. 2415–2423.
22. Berthelot K., Delmotte F. M. Purification and characterization of an  $\alpha$ -glucosidase from *Rhizobium* sp. (*Robinia pseudoacacia* L.) strain USDA 4280 // Appl Environ Microbiol. — 1999. — V. 65, N7. — P. 2907–2911.
23. Yamamoto T., Unno T., Watanabe Y. et al. Purification and characterization of *Acremonium implicatum* alpha-glucosidase having regioselectivity for alpha-1,3-glucosidic linkage // Biochim. Biophys. Acta. — 2004. — V. 1700, N2. — P. 189–198.
24. Torre-Bouscoulet M. E., Lopez-Romero E., Balcazar-Orozco R. et al. Partial purification and biochemical characterization of a soluble alpha-glucosidase II-like activity from *Candida albicans* // FEMS Microbiol. Lett. — 2004. — V. 236, N1. — P. 123–128.
25. Marin D., Linde D., Lobato M. F. Purification and biochemical characterization of an alpha-glucosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous* // Yeast. — 2006. — V. 23, N2. — P. 117–125.
26. Sato F., Okuyama M., Nakai H. et al. Glucoamylase originating from *Schwanniomycetes occidentalis* is a typical alpha-glucosidase // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2005. — V. 69, N10. — P. 1905–1913.
27. Schiraldi C., Martino A., Acone M. et al. Effective production of a thermostable alpha-glucosidase from *Sulfolobus solfataricus* in *Escherichia coli* exploiting a microfiltration bioreactor // Biotechnol. Bioeng. — 2000. — V. 70, N6. — P. 670–676.
28. Yoshikawa K., Yamamoto K., Okada S. Classification of some alpha-glucosidases and alpha-xylosidases on the basis of substrate specificity // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 1994. — V. 58, N8. — P. 1392–1398.
29. Muslin E. H., Kanikula A. M., Clark S. E. et al. Overexpression, purification, and characterization of a barley alpha-glucosidase secreted by *Pichia pastoris* // Protein Exp. Pur. — 2000. — V. 18, N1. — P. 20–26.
30. Hehre E. A fresh understanding of the stereochemical behavior of glycosylases: structural distinction of «inverting» (2-MCO-type) versus «retaining» (1-MCO-type) enzymes // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. — 1999. — V. 55. — P. 265–310.
31. Liu W., Madsen N., Braun C. et al. Reassessment of the catalytic mechanism of glycogen debranching enzyme // Biochemistry. — 1991. — 30, N5. — P. 1419–1424.
32. Weiser W., Lehmann J., Chiba S. et al. Steric course of the hydration of D-gluco-octenitol catalyzed by alpha-glucosidases and by trehalase // Biochemistry. — 1988. — V. 27, N7 — P. 2294–2300.
33. Matsui H., Blanchard J.S., Brewer C. F. et al. Alpha-secondary tritium kinetic isotope effects for the hydrolysis of alpha-D-glucopyranosyl fluoride by exo-alpha-glucanases // J. Biol. Chem. — 1989. — V. 264, N15. — P. 8714 — 8716.
34. Vlkova E., Nevoral J., Jencikova B. et al. Detection of infant faecal bifidobacteria by enzymatic methods // J. Microbiol. Methods. — 2005. — V. 60, N3. — P. 365–373.



**МИКРОБНЫЕ  $\alpha$ -ГЛЮКОЗИДАЗЫ:  
КЛАССИФИКАЦИЯ, СУБСТРАТНАЯ  
СПЕЦИФИЧНОСТЬ И МЕХАНИЗМ  
ДЕЙСТВИЯ**

*Н. В. Борзова*

Институт микробиологии и вирусологии  
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

*E-mail: nv\_borzova@bigmir.net*

В обзоре представлены данные литературы относительно систематического положения  $\alpha$ -глюкозидаз микроорганизмов в современной номенклатуре ферментов, основанной на их субстратной специфичности и молекулярном строении. Приведены сведения о распространении этих ферментов среди микроорганизмов, в том числе экстремофильных, их физико-химических и каталитических свойствах, а также о субстратной специфичности и механизме действия.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -глюкозидаза, классификация, свойства, специфичность, механизм действия.

**MICROBIAL  $\alpha$ -GLUCOSIDASES:  
CLASSIFICATION, SUBSTRATE  
SPECIFICITY AND MECHANISM  
OF ACTION**

*N. V. Borzova*

Institute of microbiology and virology  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

*E-mail: nv\_borzova@bigmir.net*

The present review focuses on systematic identification of microbial  $\alpha$ -glucosidases in present enzyme nomenclature, which basis on substrate specificity and molecular structure. Particular attention is given to  $\alpha$ -glucosidase occurrence among microorganisms, including extremophiles, their physical and chemical properties, catalytical abilities, substrate specificity and mechanism of action.

**Key words:**  $\alpha$ -glucosidase, classification, properties, specificity, mechanism of action.