



Termofile jako źródło α -glukozydaz użytecznych w produkcji syropów glukozowych

Józef Synowiecki, Anna Zdziebło

Katedra Chemii i Technologii Żywności, Wydział Chemiczny,
Politechnika Gdańska, Gdańsk

Thermophiles as a source of α -glucosidases suitable for production of glucose syrups

Summary

α -Glucosidases release terminal, 1,4- and to lesser extent, 1,6- linked α -glucose residues of disaccharides, oligosaccharides, and aryl-glucosides. Among these, novel thermostable enzymes from hyperthermophiles and moderate thermophiles have been investigated. The aim of this article is to demonstrate different sources of thermostable α -glucosidases, as well as properties and suitability of these enzymes for production of glucose at 90-100°C, e.g., during one step process initiated by starch liquefaction using commercial α -amylase (Termamyl®).

Key words:

α -glucosidases, starch saccharification, *Pyrococcus furiosus*, *Bacillus licheniformis*, *Sulfolobus solfataricus*, *Thermococcus hydrothermalis*, amyloglucosidases, glucose syrups.

Adres do korespondencji

Józef Synowiecki,
Katedra Chemii
i Technologii Żywności,
Wydział Chemiczny,
Politechnika Gdańska,
ul. Gabriela Narutowicza
11/12,
80-952 Gdańsk.

1. Wprowadzenie

Do scukrzania skrobi podczas wytwarzania syropów glukozowych stosuje się zazwyczaj glukoamylazę (EC 3.2.1.3). Enzym ten rozszczepiając wiązania α -1,4-glikozydowe oraz ze znacznie mniejszą szybkością α -1,6- i α -1,3-glikozydowe oddziela reszty glukozylowe od nieredukującego końca cząsteczek amylozy, amylopektyny i glikogenu (1). Skutkiem długotrwałej reakcji jest

prawie całkowite scukrzenie skrobi. Szybkość hydrolizy maleje jednak podczas trwania procesu, m.in. wskutek zmian konformacji enzymu pod wpływem kationów Ca^{2+} dodawanych do zawiesiny ziaren skrobiowych w celu zwiększenia aktywności i termostabilności α -amylazy z *Bacillus licheniformis*, Termamyl® (2). Inną przyczyną zmniejszenia szybkości scukrzania jest nasilające się hamowanie produktem reakcji oraz nagromadzanie wolniej rozkładanych od skrobi małowcząsteczkowych oligosacharydów i dekstryn granicznych zawierających wiązanie α -1,6-glikozydowe, względem którego enzym wykazuje niewielką aktywność. Zawartość glukozy w produkcie obniża ponadto resynteza maltozy i izomaltozy wywołana wzrostem stężenia glukozy w syropie oraz reakcje rewersji katalizowane przez transglukozydazę (EC 2.4.1.24) znajdującą się niekiedy w niedostatecznie oczyszczonych, handlowych preparatach glukoamylaz (1). Wytwarzane w tych reakcjach cukry są mało podatne na oddziaływanie glukoamylazy i kumulują się w syropie. Ich nagromadzanie można ograniczyć stosując α -glukozydazę (maltazę) o preferencyjnej aktywności względem maltozy i małowcząsteczkowych oligosacharydów. Istnieje mało dotychczas zbadana możliwość zastąpienia glukoamylaz pululanazami (EC 3.2.1.41) i α -glukozydazami (EC 3.2.1.20) współdziałającymi ze sobą podczas scukrzania skrobi. Zaletą takiego układu enzymatycznego jest skrócenie czasu trwania procesu, ograniczenie zanieczyszczenia wyrobu oligosacharydami tworzącymi się wskutek rewersji glukozy oraz podwyższenie temperatury scukrzania, eliminujące konieczność chłodzenia mieszaniny reakcyjnej po zakończeniu upłynniania prowadzonego w 95-105°C. Optymalna temperatura działania stosowanych aktualnie glukoamylaz nie przekracza zazwyczaj 60-70°C. Natomiast znane są już pochodzące z termofilnych drobnoustrojów pululanazy i α -glukozydazy o maksymalnej aktywności w temperaturze ponad 100°C (3). Zdolność katalizowania transglikozylacji przez niektóre α -glukozydazy umożliwia zastosowanie tych enzymów w produkcji rozmaitych oligosacharydów i ich pochodnych. Związki te syntetyzowane metodami chemicznymi są zanieczyszczone pewną ilością niepożądanych anomerów (4). Dla uzyskania produktów prawie zupełnie pozbawionych zanieczyszczeń konieczne jest jednak poszukiwanie α -glukozydaz o jeszcze lepszej stereospecyficzności od dotychczas stosowanych.

2. Specyficzność działania

α -Glukozydazy są grupą enzymów różniących się specyficznością i oddzielających reszty glukozytowe poprzez rozszczepienie wiązań α -1,4-glikozydowych lub z mniejszą aktywnością α -1,6-glikozydowych od nieredukującego końca cząsteczek disacharydów, oligosacharydów lub niekiedy polisacharydów. Enzymy te różnią się od glukoamylaz wzrastającą aktywnością względem małowcząsteczkowych substratów oraz zdolnością hydrolizowania maltozy, sacharozy i innych disacharydów. Natomiast aktywność glukoamylaz jest największa względem polisacharydów i dość szybko maleje w miarę zmniejszania się masy cząsteczkowej substratu. Głównym

produktem reakcji katalizowanych przez α -glukozydazy jest glukoza. W przypadku hydrolizy skrobi możliwe jest jednak tworzenie się pewnej ilości małowcząsteczkowych oligosacharydów poprzez katalityczne oddziaływanie enzymu przyłączonego podczas tworzenia się kompleksu przejściowego do nieredukującego końca cząsteczki polisacharydu na wiązanie glikozydowe w sąsiednim zwoju skrobiowej helisy i uwolnienie jej fragmentu złożonego z sześciu lub siedmiu reszt glukozylowych (5). Ponadto podczas zaawansowanej hydrolizy maltozy i małowcząsteczkowych oligosacharydów część wytworzonej glukozy jest zużywana w reakcjach transglikozylacji.

Zależnie od pochodzenia α -glukozydazy dzieli się na dwie grupy o odmiennej specyficzności substratowej. Do pierwszej należą α -glukozydazy hydrolizujące najwydajniej sacharozę i glikozydy zawierające alkilowe lub aryłowe reszty aglikonu, takie jak np. p-nitrofenylo- α -D-glukopiranozyd (pNPG) stosowany często do oznaczeń aktywności tych enzymów. W grupie tej znajdują się też α -glukozydazy działające na skrobię, amylozę lub oligosacharydy z wiązaniami α -1,6-glikozydowymi. α -Glukozydazy drugiego typu zwane niekiedy maltazami, wykazują największą aktywność w hydrolizie maltozy i izomaltozy oraz znacznie mniejszą względem oligosacharydów. Zwierzęce α -glukozydazy są często kompleksem kilku białek różniących się specyficznością substratową. Ich przykładem są występujące w jelicie cienkim ptaków i ssaków heterodimery złożone z dwóch rodzajów podjednostek o aktywności sacharazy/izomaltazy oraz maltazy/glukoamylazy (6). Wszystkie roślinne α -glukozydazy katalizują z dużą aktywnością hydrolizę małowcząsteczkowych α -1,4-oligosacharydów, różnią się jednak dość znacznie specyficznością działania względem oligosacharydów o większych cząsteczkach oraz disacharydów z wiązaniami α -1,2-, α -1,3- lub α -1,6-glikozydowymi. Większość tych enzymów hydrolizuje skrobię rozpuszczalną prawie z taką samą szybkością jak oligosacharydy, a niektóre degradują także ziarna skrobiowe lub katalizują reakcje transglikozylacji przekształcające maltozę w izomaltozę zawierającą wiązania α -1,6-glikozydowe (7).

3. Fizjologiczne znaczenie α -glukozydaz

α -Glukozydazy są wytwarzane w komórkach niektórych tkanek roślin i zwierząt oraz w drobnoustrojach rozkładających skrobię lub inne polisacharydy, rozwijających się np. na butwiejących szczątkach roślin. Zdolność pośredniego przyswajania polisacharydów mają tylko te drobnoustroje, które wydzielają do środowiska pozakomórkowe amylazy, pululanazy celulazy lub inne hydrolazy glikozydów degradujące makrocząsteczki substratu z wytworzeniem maltozy, izomaltozy, trehalozy, celobiozy oraz małowcząsteczkowych oligosacharydów. Dalszy metabolizm tych związków następuje już wewnątrz komórek m.in. z udziałem α -glukozydaz znajdujących się w cytoplazmie oraz w systemach błonowych mikroorganizmu (8). W nielicznych przypadkach drobnoustrojowe α -glukozydazy są enzymami pozako-

mórkowymi. W kiełkujących nasionach roślin i chloroplastach α -glukozydazy inicjują degradację ziaren skrobiowych oraz hydrolizują oligosacharydy i maltozę wytworzone w reakcjach katalizowanych przez α - i β -amylazy (7).

Lizosomalna α -glukozydaza jest ważnym ogniwem metabolizmu glikogenu magazynowanego w wątrobie i mięśniach szkieletowych człowieka i zwierząt. Degradację tego polisacharydu katalizuje fosforylaza glikogenowa, której działanie kończy się na rozgałęzieniach cząsteczek glikogenu. Odblokowanie działania fosforylazy poprzez usunięcie reszt glukozy maskujących wiązanie α -1,6-glikozydowe, a następnie jego rozszczepienie i likwidację rozgałęzienia następuje kolejno pod wpływem transferazy oligosacharydów i α -glukozydazy. Brak α -glukozydazy jest przyczyną genetycznie uwarunkowanego zaburzenia magazynowania glikogenu u niemowląt zwanego chorobą Pompego. Jej objawami są zakłócenia pracy serca i układu oddechowego prowadzące do zgonu następującego zwykle przed upływem dwóch lat życia (9). α -Glukozydazy znajdują się też w soku jelitowym uczestnicząc w trawieniu dostarczanych z pokarmem polisacharydów. Inaktywację α -glukozydazy stosuje się w terapii insulino-niezależnej cukrzycy. Aktywnym składnikiem stosowanego w tym przypadku leku opracowanego przez firmę Bayer jest akarboza, pochodna maltotetraozy, oddziałująca jako silny inhibitor α -glukozydazy i innych enzymów amyliolitycznych (10).

4. Źródła termostabilnych α -glukozydaz

Termostabilne enzymy amyliolityczne są wytwarzane przez niektóre bakterie rodzaju *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermotoga*, *Thermosiphon*, *Fervidobacterium* i *Aquifex* oraz archebakterie występujące w rzędach *Sulfolobales*, *Pyrodictales*, *Thermococcales*, *Thermoplasmatales* i *Thermoproteales*, pochodzące m.in. z gorących źródeł lub hydrotermalnych obszarów dna mórz i oceanów (11). W przeprowadzonych przez Legina i wsp. badaniach wykazano, że około 26% ogólnej ilości 269 analizowanych drobnoustrojów rozwijających się w temperaturze ponad 60°C wytwarza α -amylazy, pululanazy i α -glukozydazy, umożliwiające przyswajanie glikogenu znajdującego się w martwych organizmach zwierzęcych osiadających na dnie wymienionych zbiorników wodnych (12).

α -Glukozydazy przydatne do scukrzania syropu maltodekstrynowego wytworzonego w etapie upłynniania skrobi powinny działać w temperaturze około 100°C przy pH 5,5-6,0. Eliminuje to konieczność ochładzania mieszaniny reakcyjnej i regulacji jej kwasowości przed dodaniem enzymu oraz zapobiega niepożądanym reakcjom brunatnienia w obojętnym lub alkalicznym środowisku. Takie właściwości mają α -glukozydazy wytwarzane przez archebakterie *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei*, *Sulfolobus solfataricus*, *Thermococcus hydrothermalis*, i kilka innych hipertermofilnych drobnoustrojów (tab. 1). Charakterystyczną cechą α -glukozydaz wyizolowanych z tych mikroorganizmów jest wysoka optymalna temperatura działania wy-

nosząca zależnie od pochodzenia enzymu 85-115°C i podobna zależność aktywności od kwasowości środowiska reakcji. Wymienione α -glukozydazy działają najwydajniej przy pH 5,0-5,5 z wyjątkiem enzymu z *Thermococcus zilligii* uzyskującego największą aktywność w środowisku obojętnym (36). Enzymy pochodzące z termofilnych eubakterii mają mniejszą termostabilność i ulegają szybkiej inaktywacji po przekroczeniu optymalnej temperatury działania wynoszącej zazwyczaj 60-75°C. α -Glukozydazy wytwarzane przez hipertermofile nie są jeszcze produkowane na skalę przemysłową, m.in. z powodu utrudnionej hodowli i małej wydajności biomasy tych mikroorganizmów. Istotne znaczenie w metabolizmie hipertermofili ma siarka elementarna, często dodawana do pożywek dla tlenowych lub beztlenowych archebakterii. Podczas rozwoju aerobowych hipertermofili następuje utlenienie siarki do kwasu siarkowego przebiegające w silnie kwaśnym środowisku o pH 2,0-3,0 (37). Część uzyskanej energii jest w tym przypadku zużywana do usuwania z cytoplazmy nadmiaru przenikających ze środowiska protonów, co zapobiega jej zakwaszeniu i inaktywacji enzymów oraz denaturacji innych ważnych fizjologicznie białek. Mikroorganizmy tlenowe nie przystosowały się do środowisk o temperaturze wyższej od 85°C m.in. wskutek zbyt małej dostępności tlenu wywołanej znacznym zmniejszeniem jego rozpuszczalności (38). Termofilne archebakterie, z wyjątkiem niektórych *Sulfolobales*, rozwijających się w temperaturach około 80°C, są zazwyczaj obligatoryjnymi beztlenowcami, często przyswajającymi siarkę elementarną z wytworzeniem siarkowodoru lub innych jej związków. Hipertermofilne heterotrofy mogą przyswajać białka i/lub polisacharydy, a zawartość siarki w pożywce nie jest obligatoryjna. Jej wprowadzenie do środowiska przyspiesza jednak znacznie rozwój tych drobnoustrojów wskutek zaniku wydzielania wytwarzanego podczas fermentacji wodoru, działającego jako inhibitor niektórych szlaków metabolicznych. Produkowany w tym przypadku toksyczny i działający korozyjnie siarkowodor jest niepożądanym produktem ubocznym hodowli mikroorganizmu.

Tabela 1

Źródła i optymalne warunki działania niektórych drobnoustrojowych α -glukozydaz

Mikroorganizm źródłowy	Optymalna temperatura rozwoju mikroorganizmu [°C]	Optymalne warunki działania:		Czas półtrwania w podanej temperaturze	Literatura
		temperatura [°C]	pH reakcji		
1	2	3	4	5	6
grzyby i drożdże:					
<i>Aspergillus niger</i>	37	37	7,0	–	(13)
<i>Avreobasidium pullulans</i>	28	60	4,0	–	(14)
<i>Candida albicans</i>	37	37	6,0	–	(15)
<i>Brettanomyces lambicus</i>	28	40	6,2	–	(16)

1	2	3	4	5	6
bakterie:					
<i>Bacillus F5</i>	25	45	6,2	–	(17)
<i>Bacillus cereus</i>	35	37	6,8	0,2 h/48°C	(18)
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	37	37	6,5	–	(19)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	37	37	7,0	–	(20)
<i>Tetrabymena thermophila</i>	40	56	4,5	–	(21)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	37	40	5,3	1,0 h/40°C	(22)
<i>Bacillus caldovelox</i>	60	50-60	5,5-6,0	1,0 h/70°C	(23)
<i>Bacillus thermoglucosidius</i>	60	75	5,0-6,0	0,2 h/72°C	(24)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	60	70	6,3	–	(25)
<i>Bacillus coagulans</i>	60	50	6,8	–	(26)
<i>Bacillus caldotenax</i>	65	70	6,0-6,8	0,2 h/70°C	(27)
<i>Thermoanaerobium Tok6-B1</i>	–	79	6,0-7,0	0,4 h/76°C	(28)
<i>Bacillus flavocaldarius</i>	76	78	6,2	0,1 h/90°C	(29)
<i>Cl. thermohydrosulfuricum</i>	65	75	5,0-5,5	0,5 h/75°C	(30)
archebakterie:					
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	87	105	4,5-5,5	3,0 h/95°C	(31)
<i>Sulfolobus shibatae</i>	81	85	5,5	–	(32)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	100	115	5,5	48 h/98°C	(33)
<i>Pyrococcus woesei</i>	100	110	5,0-5,5	–	(34)
<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	85	110	5,0-5,5	27 h/96°C	(35)

Pożywka stosowana do hodowli hipertermofili nie powinna zawierać glukozy ani wolnych aminokwasów. Wynika to z reaktywności tych substancji w podwyższonej temperaturze powodującej wytwarzanie rozmaitych produktów hamujących rozwój mikroorganizmów (37). Archebakterie *Pyrococcus furiosus* i *Thermococcus litoralis*, o optymalnych temperaturach rozwoju 100 i 88°C, a zapewne i inne hipertermofile nie wchłaniają glukozy tylko maltozę i małowcząsteczkowe peptydy. Związki te są mniej termolabilne i dopiero wewnątrz komórek ulegają degradacji w środowisku zabezpieczającym przed niepożądanymi przemianami wytworzonej glukozy. Toksyczne oddziaływanie produktów cieplnych przemian glukozy na drobnoustroje jest prawdopodobnie jedną z przyczyn dość rzadkiego występowania termofili wydzielających pozakomórkowe α -glukozydazy.

Niewielka wydajność produkcji biomasy przez hipertermofile wytwarzające termostabilne α -glukozydazy o pożądanych właściwościach, konieczność prowadzenia hodowli w podwyższonej temperaturze w warunkach beztlenowych, oraz często spotykane wydzielanie toksycznych i działających korozyjnie metabolitów znacznie utrudniają pozyskanie biomasy mikroorganizmów w ilości wystarczającej do przemysłowej produkcji tych enzymów. Wyeliminowanie tych niedogodności oraz zwiększenie wytwarzania enzymu w komórkach umożliwi ekspresja odpowiednich ge-

nów hipertermofili w mikroorganizmach mezofilnych. Dość trudno wytłumaczyć małą liczbę artykułów o nadekspresji genów hipertermofilnych α -glukozydaz w komórkach mezofilnych drobnoustrojów. Dotychczas przeprowadzono tylko w pełni udaną próbę klonowania genu α -glukozydazy z archebakterii *Sulfolobus solfataricus* (39). Natomiast komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae* transformowane plazmidem z genem α -glukozydazy z *Thermococcus hydrothermalis* wytwarzały enzym o gorszej termostabilności od wyizolowanego z macierzystej bakterii (40). Próby ekspresji rozmaitych genów hipertermofili w mikroorganizmach mezofilnych są zazwyczaj udane, a wytworzone enzymy uzyskują prawidłową konformację zapewniającą oczekiwane właściwości katalityczne pomimo znacznie niższej temperatury cytoplazmy, w której przebiegają modyfikacje potranslacyjne. W niektórych przypadkach enzymy hipertermofili enzymy po ich ekspresji w komórkach mezofili zmieniają lub tracą aktywność oraz uzyskują mniejszą termostabilność. Główną tego przyczyną jest nieprawidłowość modyfikacji potranslacyjnych spowodowana m.in. zanikiem tworzenia wewnątrz- i/lub międzycząsteczkowych wiązań disulfidowych oraz innych oddziaływań stabilizujących cząsteczki (41). Innym powodem ukształtowania nieprawidłowej konformacji cząsteczek może też być brak w komórkach mezofilnego gospodarza odpowiednich białek opiekuńczych. Uformowanie prawidłowej konformacji i uzyskanie pierwotnych właściwości katalitycznych zapewnia często inkubacja enzymu w podwyższonej temperaturze, zbliżonej do temperatury środowiska rozwoju macierzystego hipertermofila. Należy też unikać izolowania i przechowywania termostabilnych enzymów w zbyt niskiej temperaturze. Kilkogodzinna inkubacja α -glukozydazy z *Pyrococcus furiosus* lub ekstraktu bezkomórkowego, służącego do jej otrzymywania w 4°C zmniejszyła aktywność enzymu prawie o 50%, prawdopodobnie wskutek niepożądanego agregacji cząsteczek białka (33).

5. Właściwości termostabilnych α -glukozydaz

Ze względu na dużą termostabilność i wysoką temperaturę działania najbardziej przydatne w przetwórstwie skrobi są α -glukozydazy pochodzące ze „spokrewnionych” wzajemnie archebakterii *Pyrococcus furiosus* i *Pyrococcus woesei*. Induktorem syntezy enzymu w komórkach *Pyrococcus furiosus* są węglowodany, w których występują wiązania α -1,4-glikozydowe (33). Około 10% ogólnej ilości wytworzonej α -glukozydazy przechodzi do cieczy pohodowlanej, prawdopodobnie z powodu częściowej lizy komórek drobnoustroju (33). Hipotezę tę potwierdza pojawienie się pozakomórkowej aktywności enzymu dopiero w późnej fazie hodowli archebakterii (42). W przeciwieństwie do wielu innych α -glukozydaz enzym wytwarzany przez *Pyrococcus furiosus* jest zupełnie nieaktywny względem skrobi oraz sacharozy i wykazuje dużą aktywność specyficzną hydrolizy maltozy (1760 U/mg białka), znacznie większą niż izomaltozy (951 U/mg) i pNPG (287 U/mg). Aktywność tej α -glukozydazy niewiele zmienia się w zakresie od 105 do 115°C i maleje o około 50% po obniżeniu tempera-

tury reakcji do 98°C (33). Częsteczka enzymu jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym o masie cząsteczkowej 125 kDa, wykazującym dużą termostabilność zapewniającą około 2-dobowy okres półtrwania aktywności w temperaturze 98°C (44). Szybka inaktywacja kwasem diaminotetraoctowym (EDTA) wskazuje na oddziaływanie niektórych kationów jako aktywatorów i/lub stabilizatorów konformacji cząsteczek enzymu (33,44). Produkcję α -glukozydazy z *Pyrococcus furiosus* utrudnia niewielka wydajność biomasy komórek, nie przekraczająca 2,6 g/l, oraz konieczność prowadzenia hodowli w warunkach beztlenowych (43).

Podobną specyficzność substratową mają też α -glukozydazy z *Thermococcus hydrothermalis* i acidofilnego hipertermofila *Sulfolobus solfataricus* przejawiające preferencyjną aktywność wobec maltozy i mniejszą względem izomaltozy i innych disacharydów z wiązaniami α -1,6-glikozydowymi oraz glikozydów z aryłowymi resztami aglikonu (45,46). Wymienione enzymy katalizują hydrolizę oligosacharydów zbudowanych z 3 do 7 reszt glukozylowych, uwalniając glukozę i maltozę. Natomiast skrobia i wielkocząsteczkowe dekstryny nie są przez nie degradowane. α -Glukozydaza z *Thermococcus hydrothermalis* w 96°C przy pH 5,0-5,5 przejawia ponad 60% maksymalnej aktywności uzyskiwanej w 110°C. Stosunkowo niewielki czas półtrwania aktywności tego enzymu (2 h) w 96°C może być zwiększony do 27 h w przypadku 10% stężenia skrobi w środowisku reakcji (46). Właściwości te umożliwiają dobre współdziałanie z aktywną w podobnych warunkach termostabilną α -amylazą (Termamyl®), stosowaną w celu wytworzenia ze skrobi małowcząsteczkowych maltodekstryn podatnych już na oddziaływanie α -glukozydazy.

Natomiast α -glukozydaza z *Sulfolobus solfataricus* ma mniejszą termostabilność pomimo dość wysokiej optymalnej temperatury działania (105°C) o 20°C wyższej od temperatury naturalnego środowiska bytowania mikroorganizmu. Dość krótki czas półtrwania (3 h) tego enzymu w 95°C wskazuje na zróżnicowanie czynników zapewniających ciepłą oporność białek z *Sulfolobus solfataricus* oraz *Pyrococcus furiosus* i *Thermococcus hydrothermalis* (31). α -Glukozydaza z *Sulfolobus solfataricus* jest enzymem wewnątrzkomórkowym osiągającym maksymalną aktywność przy pH 4,5-5,5, znacznie wyższym od kwasowości środowiska rozwoju wytwarzającego ten enzym drobnoustroju (tab. 1).

Eubakterie rodzaju *Bacillus* wytwarzają α -glukozydazy mało przydatne w przetwórstwie skrobi ze względu na dość małą termostabilność, niewiele większą od oporności cieplnej stosowanych obecnie glukoamylaz. Okres półtrwania aktywności zewnątrzkomórkowego enzymu z *Bacillus thermoglucosidius* w temperaturze maksymalnej aktywności (72°C) wynosi zaledwie 10 minut (24). Spośród mikroorganizmów rodzaju *Bacillus* największą termostabilność ma α -glukozydaza wytwarzana przez *Bacillus caldovelox*, której aktywność maleje o 50% dopiero po 1 h termostatowania w 70°C (23). W przeprowadzonych przez nas badaniach wykazano natomiast, przydatność skrajnie termofilnej, tlenowej eubakterii *Thermus thermophilus* HB-8 jako źródła wewnątrzkomórkowego enzymu o aktywności α -glukozydazy, którego czas półtrwania w optymalnej temperaturze działania (85°C) wynosi około 2 h (47). Wy-

mieniona bakteria jest dość dobrym źródłem niektórych termostabilnych enzymów ze względu na krótki, wynoszący około 35 minut czas generacji, zapewniający satysfakcjonującą wydajność biomasy i możliwość hodowli w warunkach tlenowych na podłożach drożdżowo-peptonowych.

6. Podsumowanie

W dotychczas opublikowanych badaniach termostabilnych α -glukozydaz wskazano na możliwość ich stosowania zamiast glukoamylaz podczas jednoetapowego wytwarzania syropu glukozowego bez konieczności podziału procesu na prowadzone w różnych warunkach odrębne etapy upłynniania i scukrzania. W celu praktycznego wykorzystania tej możliwości należy poszerzyć wiedzę dotyczącą rozmaitych źródeł termostabilnych α -glukozydaz, ze szczególnym uwzględnieniem mało dotychczas zbadanej możliwości nadekspresji tych enzymów w rekombinowanych drobnoustrojach mezofilnych. Ułatwi to hodowlę bakterii i zwiększy wydajność wytwarzania α -glukozydazy oraz umożliwi jej oczyszczanie poprzez niekosztowną termiczną denaturację i strącenie pozostałych termolabilnych białek komórkowych. Należy też dokonać wyboru α -amylazy, α -glukozydazy i ewentualnie pululanazy o takich optymalnych warunkach działania, które umożliwią ich współdziałanie podczas jednoetapowej hydrolizy skrobi.

Koszty wydawnicze dofinansowano z funduszu grantu KBN nr PBZ-KBN/021/PO6/32.

Literatura

1. James J. A., Lee B. H., (1997), *J. Food Biochem.*, 21, 1-52.
2. Kennedy J. F., Cabalda V. M., White C. A., (1988), *TIBTECH.*, 6, 184-189.
3. Synowiecki J., Grzybowska B., (2001), *Biotechnologia*, 2(53), 26-35.
4. Mala S., Dvorakova H., Hrabal R., Kralova B., (1999), *Carbohydrate Res.*, 322, 209-218.
5. Schönert S., Buder T., Dahl M. K., (1999), *Res. Microbiol.*, 150, 167-177.
6. Takesue Y., Takesue S., (1996), *Biochim. Biophys. Acta*, 1296, 152-158.
7. Frandsen T. P., Svensson B., (1998), *Plant Molecular Biol.*, 37, 1-13.
8. Urlaub H., Wöber G., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, 522, 161-173.
9. Stryer L., (1999), *Biochemia*, 621-622, PWN S.A., Warszawa.
10. Kwon O. S., Park S. H., Yun B. S., Pyun Y. R., Kim C. J., (2000), *J. Antibiotics*, 53, 954-958.
11. Antranikian G., Rüdiger A., Canganella F., Klingeberg M., Sunna A., (1995), *J. M. S.-Pure Appl. Chem.*, A32(4), 661-669.
12. Legin E., Ladrat C., Godfroy A., Barbier G., Duchiron F., (1997), *Animal Biol.*, 320, 893-898.
13. Kita A., Matsui H., Somoto A., Kimura A., Takata M., Chiba S., (1991), *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2327-2335.
14. Saha B. C., Bothast R. J., (1993), *Curr. Microbiol.*, 27, 73-77.
15. Bramono K., Tsuboi R., Ogawa H., (1995), *Mycoses*, 38, 349-353.
16. Kumara H. M., DeCort S., Verachert H., (1993), *Appl. Environm. Microbiol.*, 59, 2352-2358.
17. Yamamoto M., Horikoshi K., (1990), *Carbohydr. Res.*, 197, 227-235.

18. Suzuki Y., Aoki R., Hayashi H., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, 704, 476-483.
19. Smith K. A., Salyers A. A., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 2962-2968.
20. Albaseri K. A., Mitchell W. J., (1995), *J. Appl. Bacteriol.*, 78, 149-156.
21. Banno Y., Sasaki N., Yoshino T., Mochizuki J., Hirata H., Nozawa Y., (1989), *J. Protozool.*, 36, 562-567.
22. Fogarty W. M., Kelly C. T., Kadam S. K., (1985), *Can. J. Microbiol.*, 31, 670-674.
23. Giblin M., Kelly C. T., Fogarty W. M., (1987), *Can. J. Microbiol.*, 33, 614-618.
24. Suzuki Y., Yuki T., Kishigami T., Abe S., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, 445, 386-397.
25. Suzuki Y., Shinji M., Eto N., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, 787, 281-289.
26. Suzuki M., Tomura Y., (1986), *Eur. J. Biochem.*, 158, 77-83.
27. Suzuki Y., Sugita N., Kishimoto T., (1997), *Starch/Stärke*, 49, 148-154.
28. Plant A. R., Parrat S., Daniel R. M., Morgan H. W., (1988), *Biochem. J.*, 255, 865-868.
29. Murakami S., Yagami M., Suzuki Y., (1998), *Starch/Stärke*, 50, 100-103.
30. Saha B. C., Zeikus J. G., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 568-571.
31. Rolfmeier M., Blum P., (1995), *J. Bacteriol.*, 177, 482-485.
32. Di Lernia I., Morana A., Ottombrino A., Fusco S., Rossi M., de Rosa M., (1998), *Extremophiles*, 2, 409-416.
33. Constantino H. R., Brown S. H., Kelly R. M., (1990), *J. Bacteriol.*, 172, 3654-3660.
34. Linke B., Rüdiger A., Wittenberg G., Jorgensen P. L., Antranikian G., (1992), *DECHEMA Biotechnol. Conf.*, 5, 161-163.
35. Wimmer B., Lottspeich F., Ritter J., Bronnenmeier K., (1997), *Biochem. J.*, 328, 581-586.
36. Leveque E., Janecek S., Haye B., Belarbi A., (2000), *Enzyme Microbial Technol.*, 26, 3-14.
37. Adams M. W. W., Kelly R. M., (1994), *Bioorganic Medicinal Chem.*, 2, 659-667.
38. Lasa I., Berenguer J., (1993), *Microbiologia Sem.*, 9, 77-89.
39. Rolfmeier M., Haseltine C., Bini E., Clark A., Blum P., (1998), *J. Bacteriol.*, 180, 1287-1295.
40. Galichet A., Belarbi B., (1999), *FEBS Letters*, 458, 188-192.
41. Vieille C., Zeikus J., (2001), *Microbiol. Molecular Biol. Rev.*, 66, 1-43.
42. Bragger J. M., Daniel R. M., Coolbear T., Morgan H. W., (1989), *Appl. Microbial Biotechnol.*, 31, 556-561.
43. Krahe M., Antranikian G., Märkl H., (1996), *FEMS Microbiol. Rev.*, 18, 271-285.
44. Sunna A., Moracci M., Rossi M., Antranikian G., (1997), *Extremophiles*, 1, 2-13.
45. Legin E., Copinet A., Duchiron F., (1998), *Biotechnol. Lett.*, 20, 363-367.
46. Legin E., Copinet A., Duchiron F., (1998), *Starch/Stärke*, 50, 84-89.
47. Zdziebło A., (2001), Informacja nie publikowana.