

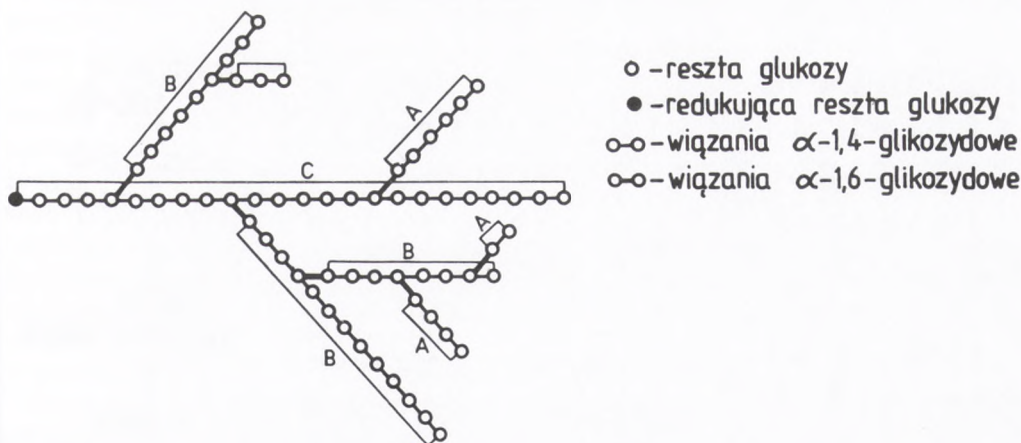
# Enzymatyczna hydroliza skrobi do syropów maltodekstrynowych i skrobiowych. Część I. Enzymy

Jolanta Bryjak  
Instytut Inżynierii Chemicznej  
Politechnika Wrocławska  
Wrocław

## 1. Wprowadzenie

Skrobia stanowi najcenniejszy materiał zapasowy roślin wyższych oraz jest najważniejszym pokarmem węglowodanowym ludzi i zwierząt. W roślinach występuje w postaci ziaren skrobiowych o różnej wielkości i kształcie, które są charakterystyczne dla źródła pochodzenia. Jakkolwiek skrobia jest homopolimerem D-glukozy, to nie stanowi jednorodnego związku, lecz jest mieszaniną różnych strukturalnie polimerów: amylozy i amylopektyny. Zakłada się, że amyloza to proste, długie łańcuchy o masie cząsteczkowej od 4 do 15 kDa, połączone między sobą jedynie wiązaniami  $\alpha$ -1,4-glikozydowymi. W rzeczywistości jest to mieszanina liniowych oraz słabo rozgałęzionych łańcuchów glukozowych i np. średnia liczba wiązań rozgałęziających  $\alpha$ -1,6-glikozydowych, w amylozie skrobi ziemniaczanej o stopniu polimeryzacji (DP) od 5 do 134, wynosi 18 [1]. Zawartość amylozy w skrobi jest cechą charakterystyczną dla danego gatunku i odmiany rośliny i może stanowić od 20 do 80% [2,3]. Łańcuchy amylozy występują w formie lewoskrętnej helisy, stabilizowanej wiązaniami wodorowymi, wewnątrz której mogą ulegać wiązaniu różne związki, m.in. jod, nadający skrobi charakterystyczne zabarwienie [4].

Amylopektyna jest polimerem rozgałęzionym, którego łańcuch centralny stanowią cząsteczki glukozy, połączone wiązaniami  $\alpha$ -1,4-glikozydowymi (tzw. łańcuch C, rozpoczynający się resztą redukującą — rys. 1), od którego odchodzą liczne odgałęzienia, tworzone przez wiązania  $\alpha$ -1,6-glikozydowe. Te ostatnie stanowią około 4% wszystkich wiązań w skrobi ziemniaczanej [2]. Wśród łańcuchów bocznych wyróżnia się z kolei łańcuchy typu A — nie posiadające odgałęzień — oraz łańcuchy B, z co najmniej jednym bocznym odgałęzieniem. Przyjmuje się, że średnia masa cząsteczkowa amylopektyny przekracza 500 kDa, ale pojedyncze cząsteczki mogą osiągać nawet 100 000 kDa. Długość łańcuchów bocznych jest zróżnicowana i średnio wynosi od 13 do



Rys. 1. Schemat budowy amylopektyny.

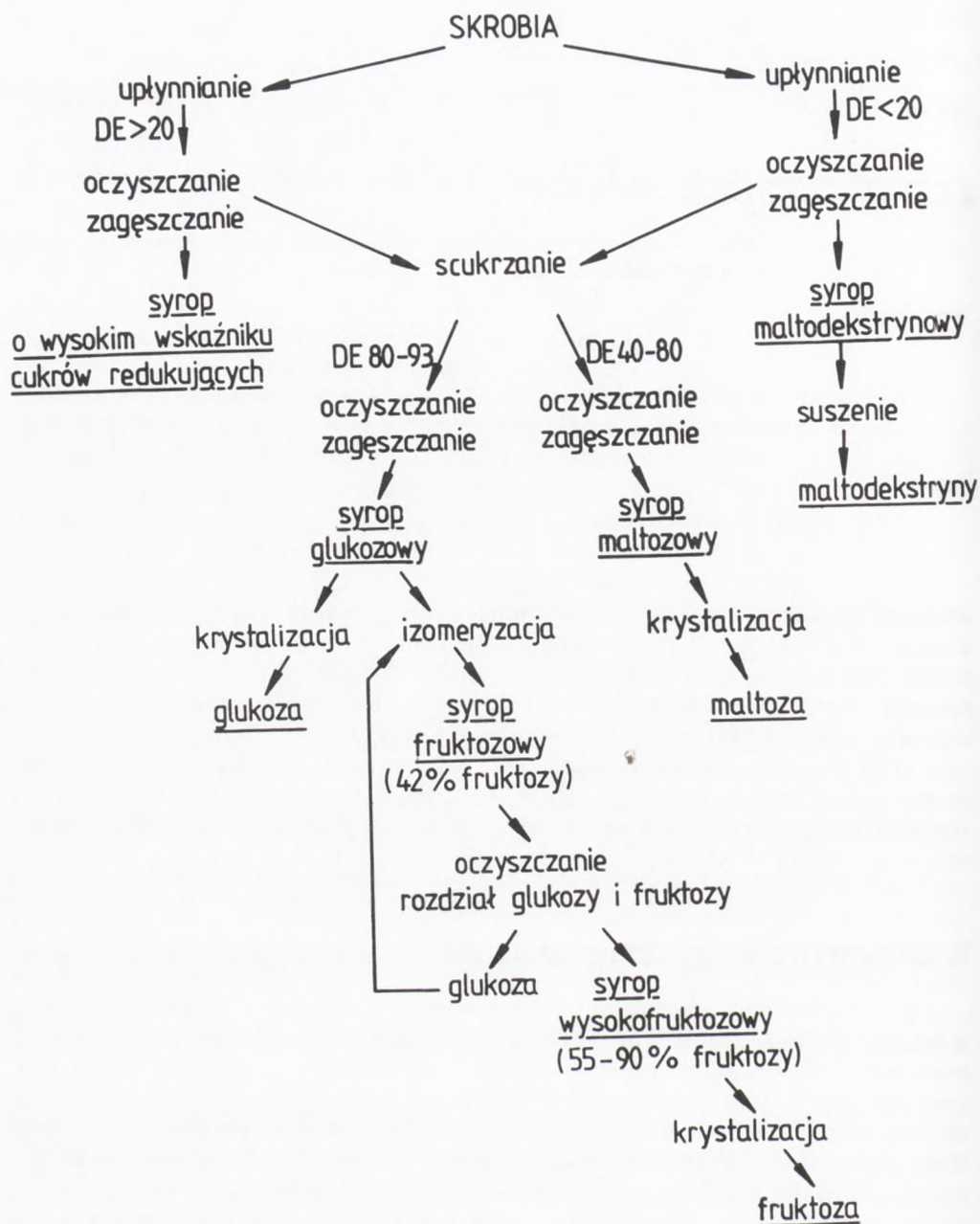
45 reszt glukozy, jakkolwiek mogą występować łańcuchy dłuższe, odpowiadające amylozie. W roztworach wodnych i w podwyższonej temperaturze cząsteczki amylopektyny ulegają żelifikacji. Amylopektyna i amyloza mogą tworzyć polimorficzne struktury krystaliczne, utworzone z regularnie upakowanych, podwójnych spirali łańcuchów skrobi [3].

Cechą charakterystyczną dla skrobi pochodzącej z bulw ziemniaka i ziemniaka słodkiego jest występowanie relatywnie dużej ilości ufosforylowanych reszt glukozy [3,5]. W skrobi ziemniaczanej występują one przede wszystkim w amylopektynie, a ich zawartość wynosi 0,081% [3].

## 2. Otrzymywanie syropów ze skrobi

Skrobia znalazła różnorakie zastosowania, szczególnie w przemyśle spożywczym, jednak najczęściej jest używana jako materiał wyjściowy do otrzymywania syropów maltodekstrynowych, maltozowych, glukozy i fruktozowych (rys. 2, [6-zmienione]). Poszczególne syropy różnią się stopniem hydrolizy skrobi i można je scharakteryzować ekwiwalentem dekstrozowym (DE), wyrażonym ilością cukrów redukujących (zwykle równoważników glukozy), przypadających na jednostkę suchej masy produktów. Przyjmuje się, że dla skrobi wartość  $DE \cong 0$ , a po pełnej hydrolizie do D-glukozy  $DE \cong 100$ .

Syropy maltodekstrynowe o  $DE < 20$  są produkowane na drodze ograniczonej hydrolizy żelowanej skrobi i, w zależności od zastosowania, posiadają wartości DE od 3 do 70 [6]. Ponieważ temu procesowi towarzyszy znaczny spadek lepkości roztworu, nosi on nazwę „upłynniania skrobi”. Produkty procesu znajdują zastosowanie jako regulatory wilgotności przetworów spo-



Rys. 2. Otrzymywanie syropów skrobiowych i maltodekstrynowych ze skrobi.

żywczych, zagęszczacze, inhibitory krystalizacji, nośniki różnych związków (np. leków), wypełniacze, plastyfikatory żywności.

Syropy glukozowe lub maltozowe otrzymuje się w procesie zwanym scukrzaniem skrobi, który jest zawsze poprzedzony jej upłynnieniem. W zależności od źródła skrobi i metody jej scukrzania, otrzymuje się syropy glukozowe o DE od 80 do 93 lub syropy maltozowe o DE od 40 do 80 [5,6]. Syropy maltozowe stosowane są głównie w przemyśle cukierniczym do zapobiegania krystalizacji sacharozy, polepszenia konsystencji przetworów spożywczych i przedłużania ich trwałości [5,7]. Dodatkowo, syropy o DE 42-49, zawierające 30-50% maltozy i 6-10% glukozy, używa się w produkcji lodów, konfitur, syropów owocowych, napojów bezalkoholowych, ciastek, mrożonej żywności oraz żywności dla diabetyków [5-7]. Syropy o DE 63-70 (30-40% maltozy i 30-50% glukozy), czyli tak zwane syropy o wysokim wskaźniku cukrów fermentujących, są łatwe do przechowywania i używane powszechnie w procesach warzenia piwa i produkcji chleba [6,8].

Zastosowanie syropów glukozowych i krystalicznej glukozy w przemyśle spożywczym i w procesach warzenia piwa jest zasadniczo takie same jak syropów maltozowych, z wyłączeniem produkcji żywności dla diabetyków, a poszerzone o produkcję żywności dla małych dzieci i niemowląt. Oczyszczona i apyrogenna glukoza, a w mniejszym stopniu także maltoza, znalazły liczne zastosowania w medycynie [5].

Syropy fruktozowe otrzymuje się przez reakcję izomeryzacji D-glukozy do D-fruktozy, co pozwala podwyższyć ponad dwukrotnie słodkość otrzymywanego syropu [5,9,10]. Ze względu na brak problemów z krystalizacją fruktozy w roztworach o wysokich stężeniach, syropy te znalazły szerokie zastosowanie w produkcji konfitur, syropów owocowych i wszelkich napojów bezalkoholowych (np. Mirinda, Pepsi Cola, Coca Cola). Ponieważ fruktoza jest metabolizowana bez udziału insuliny, używa się jej do produkcji żywności dla diabetyków [11].

Produkcja syropów ze skrobi rozpoczęła się od badań Kirchoffa, który w 1811 r. odkrył obecność cukrów prostych w roztworze skrobi potraktowanej kwasem nieorganicznym w podwyższonej temperaturze. Pod koniec XIX w. otrzymywano już w USA znaczące przemysłowo ilości syropów skrobiowych i glukozowych, stosując metodę hydrolizy kwasowej. Odkrycie enzymów amylolitycznych i metod ich taniego uzyskiwania doprowadziło do znaczących zmian w technologii otrzymywania syropów skrobiowych; zaczęto stosować metodę łączoną, to znaczy wstępną hydrolizę kwaśną, a następnie kontrolowaną hydrolizę enzymatyczną lub metodę wyłącznie enzymatycznego upłynniania. Natomiast syropy glukozowe nadal otrzymywano metodą hydrolizy kwasowej [2]. Około roku 1960 rozpoczęto scukrzanie skrobi z udziałem enzymów scukrzających, wypierając prawie całkowicie hydrolizę z udziałem kwasów. Przewagami metody enzymatycznego upłynniania i scukrzania skrobi są: niska zawartość produktów degradacji cukrów, brak zabarwienia, brak gorzkiego posmaku i zapachu, wyższa zawartość glukozy (~ 93%) w porównaniu z hydrolizatami kwasowymi (80%), możliwość stosowania wyższych stężeń substratu [2,10].

Z kolei syropy fruktozowe otrzymywano do 1965 r. metodą alkalicznej izomeryzacji, którą szybko zastąpiono enzymatyczną izomeryzacją, zapewnia-

jąca większy stopień przereagowania substratu i czystość otrzymanych produktów [10,12].

### 3. Enzymy stosowane w otrzymywaniu syropów ze skrobi

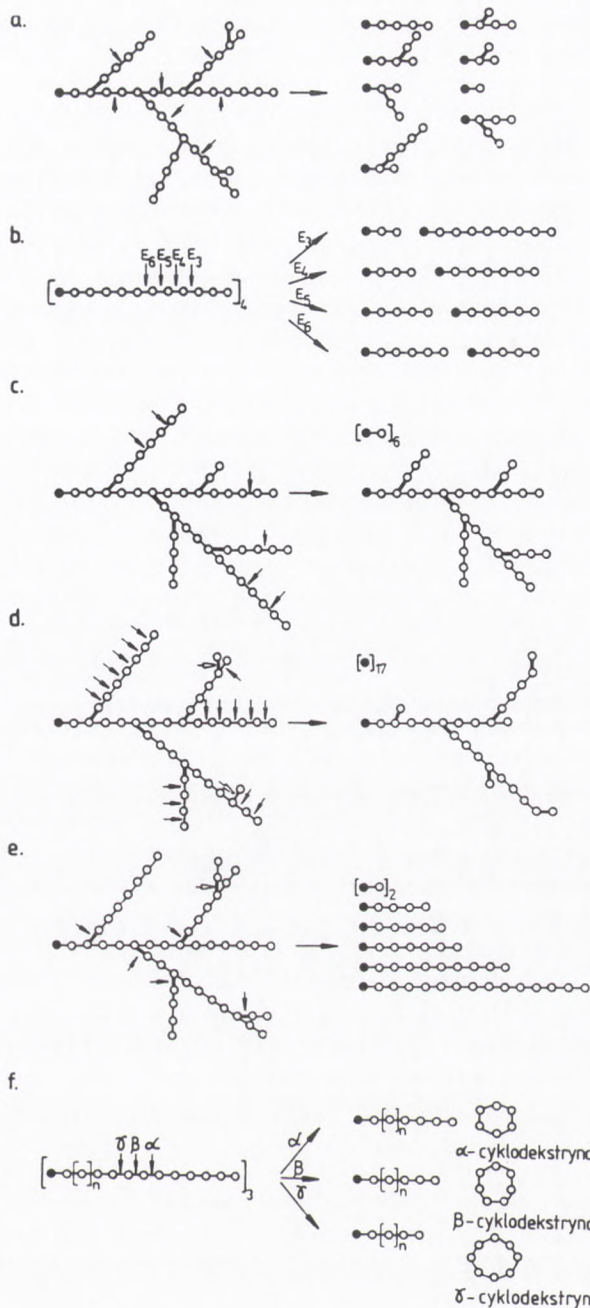
Używane w przemyśle skrobiowym do upłynniania i scukrzania skrobi enzymy są zaliczane głównie do podklasy hydrolaz, atakujących wiązania glikozydowe (EC 3.2.). W środowisku wodnym reakcje hydrolizy tych wiązań są preferowane, jednak omawiane enzymy mogą prowadzić również reakcje odwrotne do hydrolizy, tj. reakcje kondensacji, a także transglikozylacji.

Enzymy hydrolizujące skrobię można podzielić wielorako. Biorąc za podstawę możliwości hydrolizy różnych wiązań glikozydowych, dzielimy je na: atakujące wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowe ( $\alpha$ -amylazy,  $\beta$ -amylazy, egzo- $\alpha$ -amylazy), atakujące wiązania  $\alpha$ -1,6 (enzymy znoszące rozgałęzienia, jak np. izoamylazy i pululanazy) oraz atakujące wiązania  $\alpha$ -1,4, i  $\alpha$ -1,6 (glukoamylazy, niektóre pululanazy). Biorąc pod uwagę miejsce cięcia w cząsteczce skrobi, dzieli się je na endoamylazy ( $\alpha$ -amylazy, amylazy znoszące rozgałęzienia, cyklodekstrynazy) i egzoamylazy (glukoamylazy,  $\beta$ -amylazy, egzo- $\alpha$ -amylazy). Z punktu widzenia zachodzących procesów wyróżnić można enzymy upłynniające ( $\alpha$ -amylazy, izoamylazy, pululanazy, cyklodekstrynazy) i scukrzające (niektóre  $\alpha$ -amylazy,  $\beta$ -amylazy, glukoamylazy). W zależności od źródeł pochodzenia, można je podzielić na enzymy amylolyczne zwierzęce, roślinne, grzybowe i bakteryjne, a rozpatrując formę anomeryczną produktów, na enzymy uwalniające produkty w formie anomerycznej  $\alpha$  ( $\alpha$ -amylazy, enzymy znoszące rozgałęzienia, egzo- $\alpha$ -amylazy, cyklodekstrynazy i inne), lub  $\beta$  ( $\beta$ -amylazy i glukoamylazy). Na podstawie budowy przestrzennej białek i ich centrów aktywnych, można je podzielić na zawierające strukturę typu  $(\beta/\alpha)_8$  walca, charakterystyczną dla podgrupy enzymów  $\alpha$ , strukturę  $(\beta/\alpha)_5$ , występującą wśród  $\beta$ -amylaz oraz typ  $\alpha/\alpha$  walca u glukoamylaz [13-16].

Wyjątkowo duża różnorodność w potocznej klasyfikacji omawianych enzymów, jak i bardzo obszerna literatura, nie pozwalają na klarowny i pełny opis wszystkich enzymów amylolycznych. Dlatego też ograniczono się do informacji typowych dla danej grupy enzymów, a dane bardziej szczegółowe dotyczą przede wszystkim enzymów używanych w przemysłowym przetwórstwie skrobi.

#### 3.1. $\alpha$ -amylazy (EC 3.2.1.1) [5,6,11,17-31]

Są to enzymy hydrolizujące wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowe wewnątrz cząsteczki skrobi, co powoduje szybkie zmniejszenie lepkości żelowanego substratu, czyli jego upłynnienie (rys. 3a). Enzymy te są powszechnie stosowane w pierwszym etapie przetwarzania skrobi. Substratem jest żelowana skrobia, poddana wstępnej hydrolizie kwasowej lub żelowana skrobia natywna. Właściwości  $\alpha$ -amylaz różnią się znacznie, w zależności od źródła ich pochodzenia, ale obecnie amylazy roślinne i zwierzęce zostały prawie całkowicie



Rys. 3. Enzymatyczna degradacja skrobi: (a) hydroliza amylopektyny z udziałem  $\alpha$ -amylazy; (b) hydroliza amylozy przez egzo- $\alpha$ -amylazy; (c) hydroliza amylopektyny przez  $\beta$ -amylazy; (d) wczesny etap hydrolizy amylopektyny przez glukoamylazy; (e) hydroliza amylopektyny z udziałem izoamylazy; (f) hydroliza amylozy z udziałem glikozylotransferaz cyklodekstryn. ( $\uparrow$ ) miejsce cięcia substratu; pozostałe oznaczenia jak na rysunku 1.

wyparte przez tańsze: grzybowe i bakteryjne. Większość amylaz wymaga obecności jonów wapnia do przejawienia pełnej aktywności i utrzymania stabilności, ponadto przypuszcza się, że produkty hydrolizy (maltodekstryny) są inhibitorami tych enzymów.

$\alpha$ -amylazy grzybowe o znaczeniu technologicznym są produkowane głównie przez *Aspergillus oryzae* i *Rhizopus niveus*. Najbardziej znana, Taka-amylaza A (TAA) z *A. oryzae*, to  $\alpha$ -amylaza hydrolizująca amylozę całkowicie do maltozy i glukozy, natomiast amylopektynę hydrolizuje mniej wydajnie i nie do końca. Produktami hydrolizy skrobi są: glukoza, maltoza (50%), oligosacharydy zawierające od 3 do 6 reszt glukozy oraz oligosacharydy rozgałęzione ( $\alpha$ -dekstryny graniczne). Skrobia ziemniaczana jest upłynniana do DE około 80, ale kontrolując postęp reakcji można otrzymać syropy skrobiowe o DE od 30 do 80. W końcowym etapie procesu, w którym stężenie maltozy jest wysokie, zachodzą reakcje kondensacji i transglikozylacji. Optimum pH TAA wynosi 6,0-6,5; w wyższych temperaturach jest niestabilna.  $\alpha$ -amylaza z *R. niveus* hydrolizuje skrobię ziemniaczaną do DE 35, a głównymi produktami reakcji są: maltoza, śladowe ilości glukozy, oligosacharydy zawierające 3, 5 i 6 reszt glukozy oraz  $\alpha$ -dekstryny graniczne. Zaletą tego enzymu jest możliwość prowadzenia procesu hydrolizy skrobi w pH kwaśnym (4,6-4,8), które jest zbliżone do optymalnych warunków działania  $\beta$ -amylaz i glukoamylaz, natomiast jego wadą jest brak stabilności operacyjnej w temperaturach powyżej 40°C.

$\alpha$ -amylazy otrzymywane na drodze biosyntezy przez bakterie rodzaju *Bacillus* dzielimy na upłynniające i scukrzające, przy czym scukrzające są również enzymami upłynniającymi. Enzymy produkowane przez *B. subtilis* to typowy przykład  $\alpha$ -amylaz scukrzających, których produktami działania są cząsteczki zawierające od 1 do 6 reszt glukozy oraz  $\alpha$ -dekstryny graniczne. Skrobię ziemniaczaną hydrolizują do DE około 50. Typowe amylazy upłynniające są natomiast produkowane przez *B. amyloliquefaciens*. Skrobia jest hydrolizowana do DE 30, a produktami są znikome ilości glukozy, nieco więcej maltozy i maltotriozy, znaczące ilości  $G_6$  oraz dekstryny graniczne. Oba typy enzymów preferują środowisko słabo kwaśne (pH 6,0), a ich wrażliwość na temperaturę jest znacznie zróżnicowana, choć rzadko można je stosować w temperaturach powyżej 50°C.

Wyróżnić należy także szczepy bakteryjne rodzaju *Bacillus*, które produkują termostabilne amylazy upłynniające i scukrzające o dużej odporności na podwyższoną temperaturę. Producentami tych enzymów są głównie: *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*. Zjawiskiem ujemnym jest fakt, że enzymy termostabilne preferują obojętne lub słabo zasadowe środowisko reakcji, co komplikuje następne procesy, prowadzące do otrzymywania glukozy i maltozy.

Do grupy  $\alpha$ -amylaz zalicza się również produkowane przez *B. subtilis*, *B. circulans* i *Pseudomonas* sp. egzo- $\alpha$ -amylazy [11], które hydrolizują wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowe, licząc od nieredukującego końca skrobi, między 3 a 4 resztą glukozy (egzomaltotriozohydrolaza), 4 a 5 (egzomaltotetraohydrolaza, EC 3.2.1.60), 5 a 6 (egzomaltopentaohydrolaza) czy 6 a 7 (egzomaltohe-

ksaohydrolaza, EC 3.2.1.98), uwalniając oligosacharydy o 3, 4, 5, lub 6 resztach glukozowych (rys. 3b).

### 3.2. $\beta$ -amylazy (EC 3.2.1.2) [5,6,11,31-38]

Są to typowe egzoamylazy, katalizujące rozszczepienie co drugiego wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowego, licząc od nieredukującego końca łańcucha skrobi. Działanie  $\beta$ -amylaz jest zatrzymywane w odległości średnio 3 wiązań glikozydowych od miejsca położenia wiązania  $\alpha$ -1,6. Zatem amyloza jest hydrolizowana w 75 do 91%, a amylopektyna do 55-60%. Głównymi produktami są  $\beta$ -maltoza i wysokocząsteczkowe, silnie rozgałęzione  $\beta$ -dekstryny graniczne (rys. 3c), nadające roztworom znaczną lepkość.  $\beta$ -amylazy są szeroko rozpowszechnione wśród roślin wyższych. Otrzymuje się je ze skielkowanych nasion soi, jęczmienia, pszenicy, ryżu oraz z bulw słodkiego ziemniaka i innych warzyw. Znalezienie szczepów-producentów  $\beta$ -amylaz wśród takich mikroorganizmów, jak *Bacillus*, *Pseudomonas* czy *Streptomyces*, znacznie ograniczyło produkcję tych enzymów z surowców roślinnych i obecnie znaczenie przemysłowe ma jedynie  $\beta$ -amylaza z jęczmienia. Optimum pH  $\beta$ -amylaz roślinnych wynosi 4,0-5,8, a termostabilność dochodzi do 55°C, podczas gdy optymalne pH bakteryjnych waha się od 6,5 do 7,5, a temperatura mieszaniny reakcyjnej nie powinna przekraczać 45°C. Wartość DE po hydrolizie skrobi enzymami mikrobiologicznymi nie przekracza 60. Generalnie, wszystkie  $\beta$ -amylazy w wysokich stężeniach produktów prowadzą reakcję kondensacji  $\beta$ -maltozy do maltotetraozy i bardzo wolno hydrolizują maltotriozę do glukozy i maltozy. Zatem, przy dłuższych czasach reakcji, obok maltozy i dekstryn granicznych pojawić się mogą znaczące ilości glukozy i maltotetraozy. W procesach scukrzania skrobi,  $\beta$ -amylazy stosuje się dopiero po upłynięciu substratu. Korzystna jest również wstępna lub jednoczesna hydroliza substratu enzymami znoszącymi rozgałęzienia.

### 3.3. Glukoamylazy (amyloglukozydazy, $\gamma$ -amylazy) (EC 3.2.1.3) [5,6,11,35-47]

Są to enzymy odszczepiające kolejno cząsteczki glukozy od nieredukującego końca łańcucha skrobi, atakujące wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowe (rys. 3d). Ze znacznie mniejszą szybkością hydrolizowane są również wiązania  $\alpha$ -1,6-glikozydowe, jeżeli znajdują się przy nieredukującej reszcie glukozowej łańcucha. Obecność ufosforylowanych pochodnych glukozy w łańcuchu polisacharydowym blokuje działanie glukoamylaz. Enzymy te są produkowane przez liczne mikroorganizmy, jak: *Saccharomyces*, *Endomycopsis*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monascus*, *Chalara*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Clostridium* i inne, ale znaczenie przemysłowe posiadają przede wszystkim glukoamylazy syntetyzowane przez *Aspergillus* lub *Rhizopus* (*A. niger*, *A. awamori*, *R. delemar*, *R. niveus*); są one powszechnie używane w produkcji syropów glukozowych.

Glukoamylazy pochodzące z *Rhizopus* sp. hydrolizują skrobię prawie kompletnie, natomiast otrzymywane z *Aspergillus* hydrolizują ją średnio w 80%. Wszystkie glukoamylazy prowadzą również reakcję odwrotną do hydrolizy

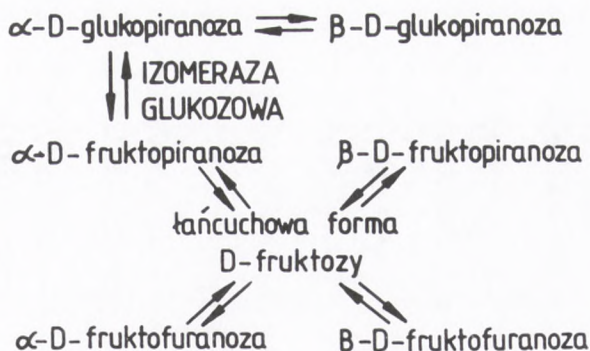


i to tym wydajniejszą, im wyższe jest stężenie glukozy. Nie hydrolizują izo-maltozy i izomaltotriozy, co, w połączeniu z katalizowaną przez nie reakcją kondensacji, nie pozwala otrzymać wyższych stopni przereagowania jak 91-93%. Przy dłuższych czasach reakcji dochodzi również do kondensacji wyższych niż  $G_3$  oligosacharydów. Wszystkie glukoamylazy występują w formach izoenzymatycznych, różniących się stabilnością i powinowactwem do wiązań  $\alpha$ -1,6-glikozydowych. Ich optimum pH zawiera się między 4,5 – 5,0, znacząca większość enzymów jest termowrażliwa, jakkolwiek występują duże różnice między enzymami wytwarzanymi przez różne szczepy. Szybkość reakcji hydrolizy skrobi jest hamowana kompetycyjnie przez glukozę i nadmiar substratu (skrobia). Inhibicję wywołują też oligosacharydy  $G_2$ - $G_6$ , będące zarazem produktami i substratami reakcji.

### 3.4. Enzymy znoszące rozgałęzienia [5-7,11,35,37,47,52-64]

Są to endoenzymy, hydrolizujące wiązania  $\alpha$ -1,6-glikozydowe (rys. 3e), również zdolne do wydajnej syntezy tych wiązań oraz do reakcji transglikozylacji. Najbardziej popularne enzymy z tej grupy to izoamylazy (EC 3.2.1.68) i pululanazy (EC 3.2.1.41). Izoamylazy hydrolizują skrobię i glikogen i są produkowane przez bakterie, grzyby i rośliny (m.in. *Cytophaga*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Lipomyces*, ziemniaki). Znaczenie przemysłowe posiada izoamylaza *Pseudomonas* sp., stosowana w kombinacji z glukoamylazą lub  $\beta$ -amylazą. Jej aktywność jest hamowana kompetycyjnie przez maltotriozę, maltotetraozę i inne maltooligosacharydy, ale nie przez glukozę i maltozę. Optymalne pH wynosi 3,0 – 4,0, a temperatura reakcji nie powinna przekraczać 40°C. Pululanazy, hydrolizujące wiązania  $\alpha$ -1,6 w skrobi, glikogenie i pululanie, są produkowane przez takie mikroorganizmy, jak *Klebsiella*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Streptomyces* oraz przez rośliny (np. ryż, jęczmień, owies, bób [5]). Znaczenie przemysłowe posiadają szczepy *K. pneumoniae* i *B. acidopullulyticus*, produkujące enzymy o  $pH_{opt}$ , odpowiednio, 6,0-6,6 i 4,9-5,2. Temperatura reakcji nie powinna przekraczać 40°C w pierwszym przypadku i 50°C w drugim. Szybkość reakcji jest silnie hamowana przez wysokie stężenia substratu (lepkość) i produktów reakcji. W obecności maltozy pululanaza przeprowadza wydajnie reakcję kondensacji.

Obecnie wyróżnia się wśród pululanaz dwa podstawowe typy enzymów. Pierwszy, hydrolizuje jedynie wiązania  $\alpha$ -1,6-glikozydowe, uwalniając głównie łańcuchy A skrobi. W skład drugiego wchodzi neopululanazy (EC 3.2.1.-) i amylopululanazy (EC 3.2.1.1/41). Posiada on wysokie powinowactwo zarówno do wiązań  $\alpha$ -1,6-glikozydowych jak i  $\alpha$ -1,4. Zastosowanie pululanaz typu drugiego w procesie hydrolizy pozwala, przeciwnie do enzymów typu pierwszego, zhydrolizować praktycznie wszystkie wiązania  $\alpha$ -1,6 w cząsteczce skrobi.



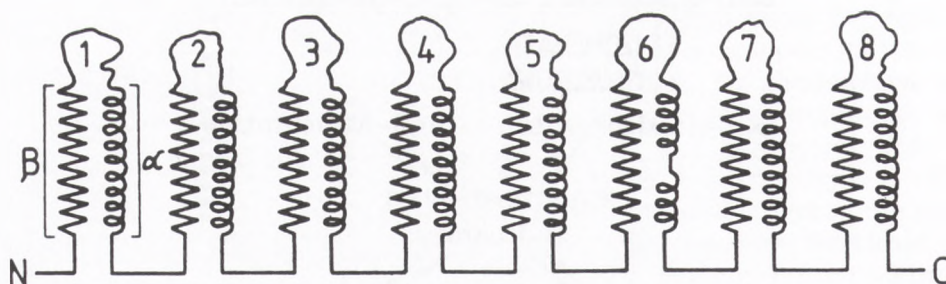
Rys. 4. Enzymatyczna izomeryzacja D-glukozy do D-fruktozy.

### 3.5. Cyklodekstrynazy (glikozylotransferazy cyklomaltodekstryn, CGTazy, EC 2.4.1.19) [11,65-67]

Są to enzymy, hydrolizujące skrobię od jej nieredukującego końca, odcinające oligosacharydy o 6, 7 lub 8 resztach glukozowych, a następnie prowadzące reakcję ich cyklizacji do cyklodekstryn:  $\alpha$  ( $G_6$ ),  $\beta$  ( $G_7$ ), lub  $\gamma$  ( $G_8$ ) (rys. 3f). Optimum pH tych enzymów wynosi zwykle 4,5-5,0, a zakres korzystnych temperatur od 50 do 90°C. Produkowane są przez *Bacillus mace-rans*, *Klebsiella pneumoniae* i *Thermoanaerobacter* sp. (głównie  $\alpha$ -cyklodekstrynaza), *B. stearothermophilus* ( $\alpha$ - i  $\beta$ -CGTazy), *B. subtilis* ( $\gamma$ -CGTaza), a także *B. circulans* (głównie  $\beta$ -CGTaza).

### 3.6. Izomeraza glukozowa (EC 5.3.1.5) [2,5,6,9-12,47,68-75]

Enzym ten należy do klasy izomeraz i jest to jego nazwa potoczna, utrwalona ze względu na jego powszechne stosowanie w procesach otrzymywania syropów fruktozowych. Prawidłowa nazwa to izomeraza ksylozowa, co oznacza, że enzym przeprowadza odwracalną reakcję izomeryzacji D-ksylozy do D-ksylulozy lub D-rybozy do D-rybulozy, a także, z dużo mniejszą szybkością, D-glukozy do D-fruktozy (rys. 4). Izomerazy glukozowe zbudowane są z 4 podjednostek i wymagają obecności jonów  $Mg^{2+}$  do przejawienia pełnej aktywności, a także jonów  $Co^{2+}$  lub/ oraz  $Mn^{2+}$  do zwiększenia stabilności w podwyższonych temperaturach. Obecność jonów  $Ca^{2+}$  powyżej stężenia 2 ppm hamuje reakcję. Znaczenie przemysłowe posiadają enzymy produkowane przez: *Streptomyces*, *Bacillus*, *Arthrobacter* i *Actinoplanes*, które są przede wszystkim magnezozależne, utrzymują wysoką aktywność w temperaturze 60°C przez kilka dni, a ich optimum pH i pH-stabilność zawierają się w przedziale 7,0-8,5.

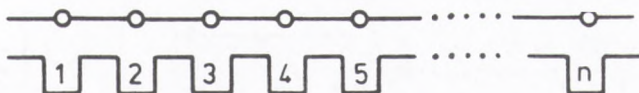


Rys. 5. Fragment łańcucha polipeptydowego, tworzący strukturę  $(\beta/\alpha)_8$  walca w podrodzynie  $\alpha$  enzymów amylolytycznych.

#### 4. Budowa i działanie enzymów amylolytycznych

Enzymy amylolytyczne, jak wspomniano, można podzielić wielorako, a jedna z możliwości oparta jest na budowie ich domeny katalitycznej (*catalytic domain*). Ścisłe określone, przestrzenne ułożenie fragmentów łańcucha polipeptydowego, głównie odcinków przyjmujących struktury II-rzędowe  $\alpha$  i  $\beta$ , pozwoliło wyróżnić trzy typowe układy. Tak też podgrupa enzymów  $\alpha$  charakteryzuje się obecnością  $(\beta/\alpha)_8$  walca,  $\beta$ -amylazy zawierają  $(\beta/\alpha)_5$  walec, a glukoamylazy strukturę typu  $\alpha/\alpha$ . Organizację kolejnych odcinków strukturalnych  $\beta$  i  $\alpha$  fragmentów łańcucha polipeptydowego, tworzących domenę katalityczną typu  $(\beta/\alpha)_8$ , przedstawiono na rysunku 5 [13,15,76]. Obszar ten jest utworzony przez osiem równoległe ułożonych w formie cylindra (*barrel*)  $\beta$ -struktur, otoczonych ośmioma odcinkami  $\alpha$ -helikalnymi. Kolejne struktury  $\beta$  i  $\alpha$  są połączone nieregularnymi fragmentami łańcucha, tworzącymi pętle 1-8. Uważa się, że w tych pętlach umiejscowione są reszty aminokwasowe centrum katalitycznego, złożonego z podmiejsca wiążących substrat oraz z podmiejsca katalitycznego. Taką organizację budowy centrum aktywnego posiadają enzymy należące do podrodziny enzymów amylolytycznych:  $\alpha$ -amylazy, egzo- $\alpha$ -amylazy,  $\alpha$ -glukozydazy, CGTazy, enzymy hydrolizujące i tworzące wiązania  $\alpha$ -1,6-glikozydowe oraz oligo-1,6-glikozydazy. Enzymy te charakteryzuje, jak już wspomniano, utrzymywanie  $\alpha$ -konfiguracji węgla anomerycznego w reszcie glukozydowej zaangażowanej w reakcję hydrolizy bądź syntezy.

Podobną organizacją charakteryzują się  $\beta$ -amylazy, których centrum aktywne tworzy walec zbudowany z pięciu struktur  $\beta$ , otoczonych pięcioma strukturami  $\alpha$  [13]. W przypadku glukoamylaz obszar katalityczny, określany mianem walca  $\alpha/\alpha$ , jest całkowicie helikalną odmianą walca  $\beta/\alpha$  [13]. Wykazano, że centrum aktywne glukoamylazy *A. awamori* jest zbudowane z 13 struktur  $\alpha$ , z których 12 tworzy dwuwarstwowy cylindryczny układ walca  $\alpha/\alpha$ , otoczony rozciągniętym O-glikozylowanym odcinkiem helikalnym [50]. Odcinek ten może być łącznikiem pomiędzy domeną katalityczną a domeną



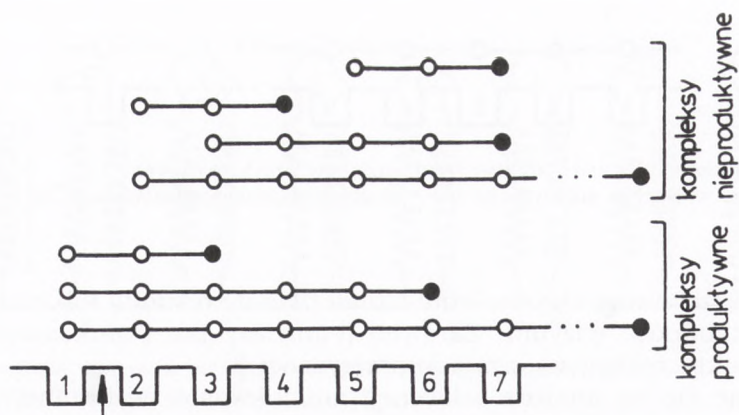
Rys. 6. Budowa obszaru katalitycznego enzymów amylolytycznych. 1,2,... — numery podmiejszc obszaru wiążącego substrat, (o-o) — reszty glukozy polisaharydu.

wiążącą niezżelowaną skrobię (*raw starch binding domain*) lub/ oraz wpływać na termostabilność enzymu. Zarówno  $\beta$ -amylazy jak i glukoamylazy uwalniają produkty reakcji w formie anomerycznej  $\beta$ .

Opierając się na analizie sekwencji aminokwasów wykazano, że w podgrupie enzymów  $\alpha$  można wyodrębnić 5 regionów o wysoce zachowawczej sekwencji aminokwasów, zawierających zawsze te same reszty, tworzące podmiejsca katalityczne (Asp<sub>206</sub>, Glu<sub>230</sub> i Asp<sub>297</sub>, według numeracji dla  $\alpha$ -amylazy z *A. oryzae*) [13,76,77]. Nie stwierdzono natomiast żadnych homologii między sekwencjami fragmentów łańcucha polipeptydowego, tworzących centrum aktywne u enzymów podrodziny  $\alpha$ , a odpowiednimi sekwencjami w  $\beta$ -amylazach i glukoamylazach.

Wyodrębniono natomiast, wśród niektórych  $\alpha$ -,  $\beta$ - i glukoamylaz, sekwencje wysoce homologiczne, występujące w domenie wiążącej niezżelowane ziarna skrobi i cyklodekstryny. Jest ona zbudowana z 8 przeciwbieżnych struktur  $\beta$  i, choć nie uczestniczy bezpośrednio w akcie katalizy, warunkuje adsorpcję enzymów na powierzchni ziaren skrobi, umożliwiając jej hydrolizę [5,13,39,41,45,50,76,78-80]. Występowanie obszaru wiążącego skrobię natywną nie poddaje się żadnej klasyfikacji i zależy jedynie od źródła pochodzenia enzymu. Tak też, wśród  $\alpha$ -amylaz, enzymy pochodzące z *Rhizopus* sp. nie posiadają takiego obszaru, w przeciwieństwie do roślinnych  $\alpha$ -amylaz scukrzających. Glukoamylazy z *A. awamori* i *A. niger* ulegają adsorpcji na natywnych ziarnach skrobi, podczas gdy izozymy produkowane przez *Rhizopus* sp. różnią się zdolnością hydrolizy niezżelowanej skrobi.  $\beta$ -amylaza z soi nie posiada domeny wiążącej skrobię natywną, natomiast wśród bakteryjnych  $\beta$ -amylaz obszar ten występuje (*Clostridium thermosulfurogenes*, *B. carotarum* B<sub>6</sub>).

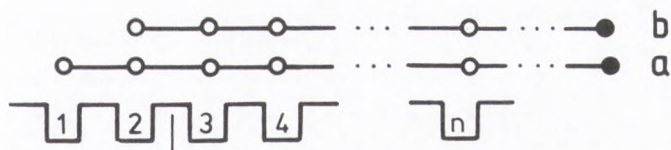
Istotną właściwością enzymów amylolytycznych i proteolitycznych oraz innych, hydrolizujących biopolimery, jest charakter centrum katalitycznego. Jest ono utworzone przez szereg przylegających do siebie podmiejszc (*subsites*), z których każde specyficznie oddziałuje z jednym merem substratu. W przypadku enzymów amylolytycznych, każde podmiejsce domeny katalitycznej łączy się z jedną resztą glukopiranozy, co przedstawiono na rysunku 6. Podmiejsca katalityczne składają się z reszt aminokwasów obecnych w nieregularnych pętach, łączących kolejne odcinki łańcucha w strukturze walca  $\beta/\alpha$  lub  $\alpha/\alpha$ . Ich przestrzenne ułożenie na powierzchni białka jest stabilizowane wysoce uporządkowaną budową walca, a w przypadku  $\beta$ -amylaz, dodatkowo mostkami disiarczkowymi [82,83]. Zgodnie z omówioną teorią organizacji obszaru katali-



Rys. 7. Tworzenie produktywnych i nieproduktywnych kompleksów glukoamylaza-substrat. (o-o) — reszty glukozowe substratu; (•) — redukująca reszta glukozowa; (↑) — miejsce położenia miejsca katalitycznego; 1,2,... — numery podmiejsca obszaru wiążącego substrat.

litycznego enzymów amylolitycznych [81,84], każde podmiejsce wiążące jedną resztę glukopiranozy substratu charakteryzuje się specyficzną wartością swobodnej energii wiązania  $\Delta G^\circ$ , wyrażaną w kJ/mol, decydująca o powinowactwie enzymu do substratu. Właściwe miejsce katalityczne, odpowiadające za reakcję hydrolizy lub syntezy wiązania glikozydowego, znajduje się pomiędzy określonymi podmiejskami wiążącymi i jest charakterystyczne dla rodzaju i źródła enzymu. W glukoamylazach i  $\beta$ -amylazach, będących typowymi egzoamylazami, to miejsce katalityczne jest zlokalizowane, odpowiednio, pomiędzy 1 a 2 i 2 a 3 podmiejscem (licząc za pierwsze podmiejsce wiążące nieredukującą resztę łańcucha polocukru). W sumie glukoamylazy mogą zawierać 7 (*R. niveus*, *R. delemar*) lub 6 (*Cradosporium resinae*) podmiejsca [5,85]. U  $\beta$ -amylaz stwierdzono natomiast występowanie 7 (soja), 6 (*B. cereus*) i 5 (pszenica) podcentrów [5,85]. Generalnie uważa się, że duża różnorodność w liczbie podmiejsca wiążących substrat oraz w położeniu podmiejsca katalitycznego w obrębie podgrupy enzymów  $\alpha$  odpowiada za sposób i miejsce cięcia polocukru. Wśród  $\alpha$ -amylaz, amylaza trzuskowa posiada 5 podmiejsca z kieszenią katalityczną zlokalizowaną między trzecim a czwartym [87]. Centrum aktywne  $\alpha$ -amylaz zbożowych obejmuje 10 podmiejsca (0-9), podobnie jak w enzymie pochodzącym z *B. amyloliquefaciens*, ale miejsce odpowiedzialne za cięcie substratu znajduje się w pierwszym przypadku pomiędzy 6 a 7 podmiejscem, a w drugim pomiędzy 5 a 6 [88]. Taka-amylaza z *A. oryzae* posiada centrum aktywne zbudowane z 9 podmiejsca z miejscem katalitycznym zlokalizowanym pomiędzy 4 a 5 podmiejscem, podczas gdy upłynniająca  $\alpha$ -amylaza z *B. subtilis* posiada ich 8, a scukrzająca 5, z podcentrum katalitycznym umiejscowionym, odpowiednio, między 6 i 7 oraz 3 i 4 podmiejscem [5].

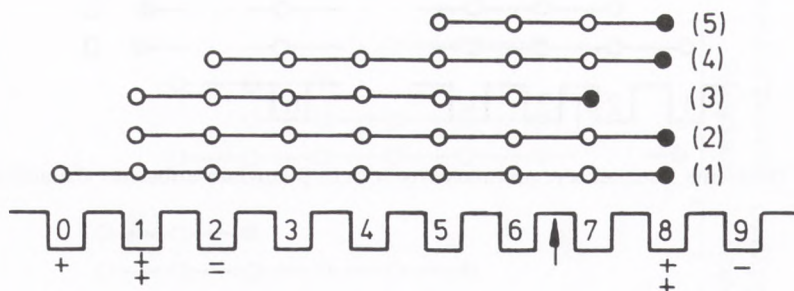
Tego rodzaju organizacja centrum aktywnego powoduje, że istnieje szereg możliwości ułożenia łańcucha polisacharydowego na powierzchni obszaru katalitycznego.



Rys. 8. Tworzenie kompleksów produktywnych (a,b)  $\beta$ -amylaza-substrat. Oznaczenia jak na rys. 7.

litycznego i utworzenia produktywnych i nieproduktywnych kompleksów enzym-substrat. W przypadku glukoamylazy, tworzenie kompleksów produktywnych i nieproduktywnych przedstawiono na rysunku 7 [81,85]. Ponieważ miejsce katalityczne znajduje się pomiędzy 1 a 2 podmiejscem wiążącym, jedynie polisacharyd zaadsorbowany tak, aby oba podcentra mogły oddziaływać z resztami glukozowymi, przy czym podmiejsce 1 dodatkowo z nieredukującym zakończeniem łańcucha, spowoduje utworzenie wiązania produktywnego. Zatem o szybkości reakcji będzie decydować prawdopodobieństwo utworzenia kompleksu produktywnego, powinowactwo podcentrów wiążących do reszt glukozowych, liczba podcentrów obsadzonych resztami glukozowymi oraz powinowactwo miejsca katalitycznego do wiązania glikozydowego. Glukoamylazy z *R. niveus*, *R. delemar* i *Cradosporium resinae*, posiadające 7 podmiejszc wiążących, charakteryzują się słabo ujemną lub bliską zera wartością energii wiązania reszty nieredukującej substratu w podcentrum 1, natomiast podmiejsce 2 posiada wysoką wartość dodatnią tej energii (około 21,0-27,2 kJ/mol) [81,85]. Kolejne podmiejsca wiążące charakteryzują się niższymi i sukcesywnie malejącymi wartościami dodatnimi energii wiązania. W przypadku enzymu z *A. niger*, o 5 podcentrach wiążących, pierwsze posiada energię słabo ujemną, drugie natomiast silnie ujemną [46,49]. Generalnie uważa się, że szybkość reakcji hydrolizy osiąga wartości maksymalne, gdy wszystkie podmiejsca obszaru wiążącego połączą się z odpowiednimi resztami glukozowymi łańcucha. Wraz ze spadkiem stopnia polimeryzacji substratu, szybkość reakcji ulega obniżeniu ze względu na większe prawdopodobieństwo utworzenia kompleksu nieproduktywnego, jak i brak oddziaływań między poszczególnymi podcentrami i resztami glukozowymi substratu. W efekcie, dla każdego oligosacharydu o stopniu polimeryzacji  $DP \leq$  liczba podmiejszc wiążących, pozorne (obserwowane) wartości  $K_m$  będą wzrastać, a wartości stałej szybkości reakcji będą się obniżać ze spadkiem stopnia polimeryzacji substratu [81,89].

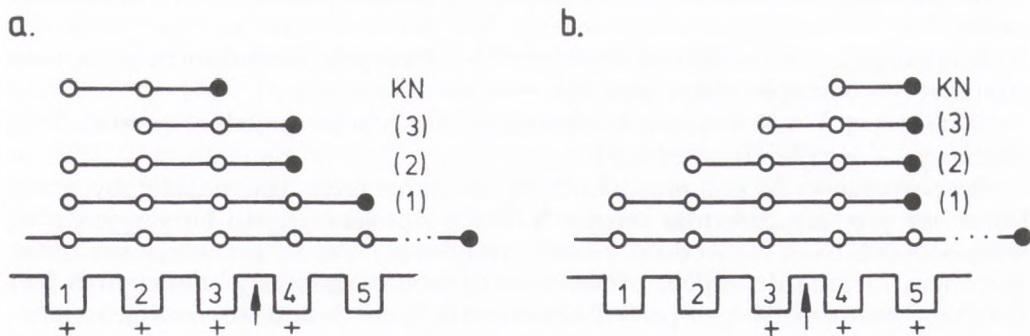
W badaniach porównawczych przeprowadzonych nad  $\beta$ -amylazami ujawniono, że dużemu różnicowaniu w liczbie podmiejszc wiążących w obszarze katalitycznym (od 5 do 7), towarzyszy względna jednolitość co do rzędu w wartościach powinowactwa poszczególnych podcentrów [83]. Podmiejsce 1 i 4 posiadają wysokie dodatnie wartości energii wiązania (odpowiednio około 29,3 i 21,0 kJ/mol), podczas gdy dla podmiejsca 2 wartość ta jest ujemna (około -25,1 kJ/mol). Podmiejsce 3 charakteryzuje się wartościami  $\Delta G^\circ$  zbliżonymi



Rys. 9. Tworzenie kompleksów produktywnych  $\alpha$ -amylaza (z jęczmienia)-substrat. (+++) — wiązanie podmiejsce-reszta glukozywa energetycznie uprzywilejowane; (--) — wiązanie podmiejsce-reszta glukozywa energetycznie dyskryminowane; (1...5) — objaśnienia w tekście; pozostałe oznaczenia jak na rys. 7.

do zera lub słabo ujemnymi, natomiast podmiejsca powyżej czwartego cechują malejące wartości dodatnie energii. W badaniach przeprowadzonych z zastosowaniem znakowanych substratów ujawniono ponadto, że  $\beta$ -amylazy tworzą 2 typy połączeń produktywnych z substratem (rys. 8 [83-zmienione]), jednakże szybkość uwalniania znakowanej glukozy od końca nieredukującego stanowi od 1/16 000 do 1/300 000 szybkości uwalniania maltozy [83], co powoduje, że można traktować połączenie typu (b) jako praktycznie nieproduktywne. Zależność szybkości reakcji od stopnia polimeryzacji substratu jest analogiczna jak dla glukoamylaz.

W przypadku  $\alpha$ -amylaz, gdzie obok dużych różnic w liczbie podcentrów wiążących (5-10) występuje duża różnorodność położenia podmiejsca katalitycznego, uważa się, że podcentrum poprzedzające podmiejsce katalityczne powinno charakteryzować się wysoką ujemną wartością energii wiązania, podczas gdy występujące za nim wartością słabo dodatnią [81]. Problemy z wyznaczeniem wartości  $\Delta G^\circ$  nie pozwalają na zbyt daleko idące uogólnienia [88,89], natomiast można wyjaśnić dużą różnorodność produktów tworzących się pod działaniem różnych  $\alpha$ -amylaz. Dla  $\alpha$ -amylazy z jęczmienia stwierdzono, że obszar katalityczny składa się z 10 podmiejsc, a miejsce cięcia substratu leży pomiędzy 6 a 7 podcentrum (rys. 9 [89-zmienione]). Budowa centrum aktywnego faworyzować będzie zatem takie produktywne ułożenie substratu, aby obsadzeniu uległy przede wszystkim podmiejsca 1 i 8. O ile nie ma to wpływu na początkowe stadium procesu hydrolizy skrobi, w którym duży substrat posiada stopień polimeryzacji znacznie większy niż liczba podmiejsc obszaru wiążącego, to w miarę postępu reakcji, dla substratu o DP = 9, jako produkty przeważać będą  $G_2$  i  $G_7$  (1), natomiast ilości  $G_6$  i  $G_3$  oraz  $G_1$  i  $G_8$  będą śladowe. Z kolei oligosacharydy  $G_8$  będą preferencyjnie hydrolizowane do  $G_2$  i  $G_6$  (2) a  $G_6$  do  $G_2$  i  $G_4$  (4). Oligosacharydy  $G_7$  nie będą ulegać adsorpcji końcem nieredukującym w podcentrum 2, czyli produktami ich hydrolizy będą  $G_1$  i  $G_6$  (3). Końcowymi produktami hydrolizy skrobi (przy



Rys. 10. Tworzenie kompleksów  $\alpha$ -amylaza-oligosacharydy przy różnych położeniach (a,b) podmiejszc o wysokim powinowactwie (+) wiązania reszt glukozowych. KN — kompleksy nieproduktywne; pozostałe oznaczenia jak na rys. 7.

założeniu niezachodzenia reakcji kondensacji) powinny być zatem niewielkie ilości  $G_1$ , znaczące  $G_2$  oraz  $\alpha$ -dekstryny graniczne, natomiast w fazie początkowej jedynie związki o wysokim DP.

W przypadku  $\alpha$ -amylazy trzustkowej, zawierającej 5 podcentrów, z podmiejszczem katalitycznym pomiędzy 3 a 4, można uwzględnić dwa podstawowe schematy hydrolizy (rys. 10 [87-zmienione]). W obu przypadkach wczesnymi jej produktami powinny być poli- i oligosacharydy o stopniu polimeryzacji  $\geq 5$ . W późniejszym etapie reakcji, zgodnie z przedstawieniem na rys. 10a, możliwe jest utworzenie wielu kompleksów produktywnych, jednakże preferowane będą ułożenia (1), (2) i (3), w których obsadzeniu będą ulegać przede wszystkim podcentra 3 i 4 oraz, dla reszty nieredukującej, podcentrum 1. W efekcie głównymi produktami reakcji będą:  $G_1$ ,  $G_2$ , znaczące ilości  $G_3$  oraz  $\alpha$ -dekstryny graniczne. Gdyby preferencyjne ułożenie wymagało interakcji z podcentrami 4 i 5, przy czym dla 5 z redukującym zakończeniem oligosacharydu (rys. 10b), to produktami reakcji byłyby:  $G_1$ , znaczące ilości  $G_2$  oraz  $\alpha$ -dekstryny graniczne. W rzeczywistości  $\alpha$ -amylaza trzustkowa pracuje zgodnie ze schematem 10b [87].

W omówionych przykładach specyficzności  $\alpha$ -amylaz nie tłumaczy się sytuacji, w których we wczesnych etapach reakcji pojawia się maltoza, maltotrioza czy maltoheksaoza. Założenie, że model działania enzymu jest zgodny z modelem przypadkowego cięcia, w którym występuje adsorpcja substratu, następnie cięcie i kolejno desorpcja produktów, powoduje, że wszystkie  $\alpha$ -amylazy należałyby zaliczyć do enzymów upłynniających. Jednakże w przedstawionym modelu budowy obszaru katalitycznego  $\alpha$ -amylaz o wielu podmiejszczach dopuszcza się i taką możliwość, że raz prawidłowo usytuowana cząsteczka substratu może się „ślizgać” nad centrum katalitycznym, bez konieczności wystąpienia kolejnych procesów adsorpcji i desorpcji [81].

W badaniach przeprowadzonych nad hydrolizą skrobi z udziałem  $\alpha$ -amylaz można było wyróżnić 3 modele ataku enzymu na substrat [81,44]:



**A** adsorpcja — 1 cięcie — desorpcja (atak przypadkowy — *random attack*);

**B** adsorpcja — maksymalnie 8 cięć — desorpcja (wielokrotny atak łańcuchowy — *multiple chain attack*);

**C** adsorpcja — hydroliza do końca — desorpcja (pojedynczy atak łańcuchowy — *single chain attack*).

Rozpatrując przykład przedstawiony na schemacie 10a należałoby oczekiwać, że przy odpowiednio długim łańcuchu polisacharydu i wyższym prawdopodobieństwie, iż produkt reakcji znajdujący się za podmiejszcem katalitycznym ulegnie desorpcji, produktem hydrolizy zgodnie z modelem B lub C byłaby maltoza. W przypadku odwrotnym, jako produktu reakcji należałoby oczekiwać maltotriozy. Rozpatrując analogicznie teoretyczną  $\alpha$ -amylazę z obszarem katalitycznym zbliżonym do przedstawionego na rysunku 9, we wczesnych etapach reakcji można oczekiwać pojawienia się maltoheksaozy (amylaza upłynniająca) lub maltozy (amylaza scukrzająca).

Specyfika badań przeprowadzanych nad liczbą podmiejszc w obszarze katalitycznym poszczególnych enzymów amylolytycznych, w których stosuje się oligosacharydy o  $DP \leq$  liczbie podmiejszc wiążących substrat, nie pozwala oszacować, czy podczas hydrolizy skrobi następuje zmiana mechanizmu reakcji z modelu B lub C na model A. Regułą, jak się wydaje, jest to, że dla wszystkich enzymów amylolytycznych i dla substratów o  $DP \leq$  liczbie podmiejszc wiążących dominuje model A, natomiast dla amylozy nie wyklucza się schematu B lub C [5,44,81,87-89]. Wydaje się również, że zwiększoną tendencją do mechanizmu B lub C posiadają enzymy o mniejszej liczbie podmiejszc w obszarze wiążącym i o charakterze scukrzającym, natomiast  $\alpha$ -amylazy upłynniające mogą się charakteryzować niewielkim (ok. 10%) udziałem mechanizmu B lub C w ogólnej puli reakcji i to tylko w przypadku amylozy jako substratu [88,89]. Z kolei w przypadku amylopektyny, prawie kompletny brak danych doświadczalnych pozwala jedynie stwierdzić, że działanie  $\alpha$ -amylazy trzustkowej jedynie częściowo przebiega zgodnie z mechanizmem wielokrotnego ataku i dotyczy przede wszystkim łańcuchów A, wyeksponowanych na zewnątrz makrocząsteczki, mimo że teoretyczna możliwość wystąpienia takiego mechanizmu hydrolizy była znacznie większa, a w hydrolizie amylozy przez ten enzym dominuje, jak wykazano, model B/C [87]. Przyniesione informacje zostały otrzymane na drodze symulacji komputerowej i częściowo eksperymentalnie.

## 5. Podsumowanie

Badania nad enzymami amylolytycznymi, mającymi zastosowanie w przemysłowym przetwórstwie skrobi, są obecnie nastawione zarówno na poszukiwanie naturalnych źródeł termostabilnych enzymów, jak i na modyfikacje już znanych amylaz poprzez ukierunkowane mutacje bądź też chemiczne modyfikacje tych białek [53,59,60,92]. Równolegle prowadzone są prace nad izolacją i oczyszczaniem enzymów [30,31,80] oraz selekcją enzymów ze zdol-

nością do adsorpcji na natywnych ziarnach skrobi. Ważnym zagadnieniem, jak się wydaje, są także badania nad blokowaniem specyficzności glukoamylaz w odniesieniu do wiązań  $\alpha$ -1,6-glikozydowych, celem ograniczenia reakcji kondensacji [90]. Podejmowane są również próby konstruowania szczepów produkujących jednocześnie i wydajnie  $\alpha$ -amylazę, glukoamylazę i pululanazę [93]. Wysoki koszt izolacji i oczyszczania zarówno CGTaz, jak i cyklodekstryn, limituje w znacznym stopniu ich produkcję, powodując poszukiwania tańszych metod ich otrzymywania [11]. Prowadzi się także badania nad enzymatyczną konwersją maltooligosacharydów i maltodekstryn do cyklodekstryn [94] oraz produkcją rozgałęzionych cyklodekstryn [66].

Szczególnie ważne, jak się wydaje, są badania nad budową obszaru katalitycznego enzymów amyloolitycznych, które obecnie mają charakter mocno rozproszony. Postuluje się poszerzenie badań o zastosowanie amylozy, amylopektyny i skrobi jako substratów [89], co w połączeniu z możliwościami symulacji komputerowej składu produktów reakcji [87] może doprowadzić do znacznego pogłębienia wiedzy o sposobie działania tych enzymów w procesach hydrolizy skrobi i umożliwić ich matematyczny opis. Zagadnieniem otwartym pozostaje również mechanizm hydrolizy wiązań glikozydowych przez glukoamylazę i  $\beta$ -amylazę, w wyniku którego powstają  $\beta$ -anomeryczne produkty [83,86,91].

## Literatura

1. Murugesan G., Shibanuma K., Hizukuri S., (1993), *Carbohydr. Res.*, 242, 203-215.
2. MacAllister R. V., (1980), *Immobilized enzymes for food processing*, Ed. Pitcher Jr., W. H., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 81-111.
3. Jane J., Shen, J. J., (1993), *Carbohydr. Res.*, 247, 279-290.
4. Yu X., Houtman C., Atalla R. H., (1996), *Carbohydr. Res.*, 292, 129-141.
5. Yamamoto T., (1988), *Handbook of amylases and related enzymes*, Ed. *The Amylase Research Society of Japan*, Pergamon Press, Oxford-Sydney-Tokyo-Toronto.
6. Lloyd N. E., Nelson W. J., (1984), *Starch: Chemistry and technology*, Eds. Whistler R. L., Bemiller J. N., Paschall E. F., 611-660, Academic Press, Orlando-Sydney-Tokyo.
7. Martensson K., (1974), *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 579-591.
8. Cheong C. G., Eom S. H., Chang C., Shin D. H., Song H. K., Min K., Moon J. H., Kim K. K., Hwang K. Y., Suh S. W., (1995), *Proteins*, 21, 105-117.
9. Quax W. J., (1993), *Trends Food Sci. Technol.*, 4, 31-34.
10. Antrim R. L., Colilla W., Schnyder B. J., (1979), *Appl. Biochem. Bioeng.*, 2, 97-155.
11. Guzman-Maldonado H., Paredes-Lopez O., (1995), *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 35, 373-403.
12. Prabhakar G., Raju D. C., (1995), *Bioproc. Engn.*, 12, 131-134.
13. Janecek S., (1994), *FEBS Lett.*, 353, 119-123.
14. Svensson B., Jespersen H., Sierks M. R., (1989), *Biochem. J.*, 264, 309-311.
15. MacGregor E. A., (1993), *Starch*, 45, 232-237.
16. Juy M., (1992), *Nature*, 357, 89-91.
17. Colguhoun I. J., Parker R., Ring S. G., Sun L., Tang H. R., (1995), *Carbohydr. Polym.*, 27, 255-259.
18. Park J. T., Rollings J. E., (1995), *Biotechnol. Bioeng.*, 46, 36-42.
19. Coma V., Copinet A., Couturier Y., Prudhomme J.-C., (1995), *Starch*, 47, 100-107.
20. Vihinen M., Peltonen T., Iitia A., Suominen I., Mantsala P., (1994), *Protein Eng.*, 7, 1255-1259.

21. Vardar-Sukan F., Sukan S. S., Ongen-Baysal G., (1993), *Biotechnol. Lett.*, 15, 657-660.
22. Castro G. R., Mendez B. S., Sineriz F., (1993), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 56, 289-294.
23. Tonkova A., Ivanova V., Dobrva E., Stefanova M., Spasova D., (1994), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 517-522.
24. Kim I.-C., Yoo S.-H., Lee S.-J., Oh B.-H., Kim Y.-W., Park K.-H., (1994), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 416-418.
25. Mizuno H., Morimoto Y., Tsukihara T., Matsumoto T., Takase K., (1993), *J. Mol. Biol.*, 234, 1282-1283.
26. Allen J. D., Thoma A., (1978), *Biochemistry*, 17, 2345-2349.
27. Welker N. E., Campbell L. L., (1967), *Biochemistry*, 6, 3681-3689.
28. de Cordt S., Vanhoof K., Hu J., Maesmans G., Hendrickx M., Tabbacq P., (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 396-402.
29. Weemaes C., de Cordt S., Goossens K., Ludikhuyze L., Hendrickx M., Heremans K., Tabbacq P., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 50, 49-56.
30. Bolton D. J., Kelly C. T., Fogarty W. M., (1997), *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 340-343.
31. Brena B. M., Pazos C., Franco-Frageras L., Batista-Viera F., (1996), *J. Chromatogr. B.*, 684, 217-237.
32. Ray R. R., Jona S. C., Nanda G., (1994), *FEBS Lett.*, 356, 30-32.
33. Nakoshima T., Matsumoto Y., Kohno M., Nitta Y., (1996), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 1033-1035.
34. Kunikata T., Nishimura S., Nitta Y., (1996), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 1104-1108.
35. Shirashi F., Kawakami K., Yuasa A., Kojima T., Kusunoki K., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 374-380.
36. Svensson B., Sagaard M., (1992), *Biochem Soc. Trans.*, 20, 34-42.
37. Houng J.-Y., Chiou J.-Y., Chen K.-C., (1991), *J. Chinese Agr. Chem. Soc.*, 29, 54-60.
38. Daussant J., Sadoweski J., Ziegler P., (1994), *J. Plant Physiol.*, 143, 585-590.
39. Tanaka A., Fukada H., Takahashi K., (1995), *J. Biochem.*, 117, 1024-1028.
40. Sanroman A., Rurado M. A., Lema J. M., (1996), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 329-336.
41. Sigurskjold B. W., Svensson B., Williamson G., Driguez H., (1994), *Eur. J. Biochem.*, 225, 133-141.
42. Darnoko D., Cheryan M., Artz W. E., (1989), *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 154-159.
43. Kimura A., Robyt J. F., (1995), *Carbohydr. Res.*, 277, 87-107.
44. Tanaka A., Takeda S., (1995), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1372-1373.
45. Takahashi T., Kawauchi S., Suzuki K., Nakao E., (1994), *J. Biochem.*, 116, 1251-1256.
46. Olsen K., Christensen U., Sierks M. R., Svensson B., (1993), *Biochemistry*, 32, 9686-9693.
47. Fogarty W. N., (1983), *Microbial enzymes and biotechnology*, Ed. Fogarty W.N., Applied Science Publisher, London-New York, 9-95.
48. Williamson G., Beshaw N. J., (1993), *Carbohydr. Polym.*, 21, 147-149.
49. Olsen K., Svensson B., Christensen U., (1992), *Eur. J. Biochem.*, 209, 777-784.
50. Cautinho P. M., Reilly P. J., (1994), *Protein Engn.*, 7, 393-400.
51. Zanin G. M., Moraes F. F., (1996), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 57, 617-625.
52. Fang T.-Y., Lin L.-L., Hsu W.-H., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 247-252.
53. Rudiger A., Jorgensen P.L., Antranikian G., (1995), *Appl. Environ. Microb.*, 61, 567-575.
54. Lauro M., Leppalainen A., Suortti T., Autio K., Poutanen K., (1993), *Carbohydr. Polym.*, 21, 151-152.
55. Wu D.-H., Wen C.-Y., Lin L.-L., Chu W.-S., Hsu W.-H., (1994), *Lett. Appl. Microb.*, 19, 67-69.
56. Jespersen H. M., MacGregor E. A., Henrissat B., Sierks M. R., Svensson B., (1993), *J. Prot. Chem.*, 12, 791-805.
57. Matuschek M., Burchhardt G., Sahn K., Bahl H., (1994), *J. Bacteriol.*, 176, 3295-3302.
58. Mathupala S. P., Zeikus J. G., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 487-493.
59. Koch R., Canganella F., Hippe H., Jahnke K. D., Antranikian G., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 1088-1094.

60. Takagi M., Lee S.-P., Imanaka T., (1996), *J. Ferment. Bioeng.*, 81, 557-559.
61. Kuriki T., Yanase M., Takata H., Imanaka T., Okada S., (1993), *J. Ferment. Bioeng.*, 76, 184-190.
62. Kuriki T., Yanase M., Takata H., Takesada Y., Imanaka T., Okada S., (1993), *Appl. Environ. Microb.*, 59, 953-959.
63. Ara K., Saeki K., Igarashi K., Takaiwa M., Uemura T., Hagihara H., Kawai S., Ito S., (1995), *Biochim. Biophys. Acta*, 1243, 315-324.
64. Ara K., Igarashi K., Saeki K., Ito S., (1995), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 662-666.
65. Bru R., Lopez-Nicolas J. M., Nunez-Delicado E., Nortés-Ruipérez D., Sanchez-Ferrer A., Garcia-Carmona F., (1996), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 61, 189-198.
66. Watanabe N., Yamamoto K., Tsuzuki W., Oya T., (1997), *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 43-47.
67. Hedges A. R., (1992), *Starch hydrolysis products*, Eds. Schenk F. W., Hebeda R. E., VCH, New York, 319.
68. Hui Z., Wei K., Xiao C., Wei L., Jiacong S., (1992), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 54, 43-46.
69. Lee C., Bagdasarian M., Meng M., Zeikus J. G., (1990), *J. Biol. Chem.*, 265, 19082-19090.
70. McKay G. A., Tavlarides L. L., (1979), *J. Mol. Catal.*, 6, 57-69.
71. Linden T., Hahn-Hagerdal B., (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 321-325.
72. Meng M., Bagdasarian M., Zeikus J. G., (1993), *Bio/Technol.*, 11, 1157-1161.
73. Wuxiang L., Jeyaseelan K., (1993), *Biotechnol. Lett.*, 15, 1101-1106.
74. Deshmukh S. S., Choudhury M. D., Shankar V., (1993), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 42, 95-104.
75. Goodenough P. W., (1995), *Mol. Biotech.*, 4, 151-166.
76. Svensson B., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 25, 141-157.
77. Jespersen H. M., MacGregor E. A., Henrissat B., Sierks M. R., Svensson B., (1993), *J. Prot. Chem.*, 12, 791-805.
78. Goto M., Kuwano E., Kanlayakrit W., Hayashida S., (1995), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 16-20.
79. Ray R. R., Jona S. C., Nanda G., (1994), *Lett. Appl. Microbiol.*, 19, 454-457.
80. Planchot V., Colonna P., Buleon A., (1997), *Carbohydr. Res.*, 298, 319-326.
81. Hiromi K., Ohnishi M., Tanaka A., (1983), *Mol. Cel. Biochem.*, 51, 79-95.
82. Mikami B., Nomura K., Morita Y., (1994), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 126-132.
83. Nitta Y., Shirakawa M., Takasaki Y., (1996), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 823-827.
84. Konda H., Nakatani H., Hiromi K., Matsuno R., (1978), *J. Biochem.*, 84, 403-417.
85. Tanaka A., Takeda S., (1994), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1809-1813.
86. Kohno M., Nitta Y., (1996), *J. Appl. Glycosci.*, 43, 161-165.
87. Nakatani H., (1996), *Biopolymers*, 39, 665-669.
88. MacGregor E. A., MacGregor A. W., Macri L. J., Morgan J. E., (1994), *Carbohydr. Res.*, 257, 249-268.
89. MacGregor A. W., Morgan J. E., MacGregor E. A., (1992), *Carbohydr. Res.*, 227, 301-313.
90. Sierks M. R., Svensson B., (1994), *Protein Engn.*, 7, 1479-1484.
91. Aleshin A. E., Stoffer B., Firsov L. M., Svensson B., Honzatko R. B., (1996), *Biochemistry*, 35, 8319-8328.
92. Chen H., Bakir U., Reilly P. J., Ford C., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 101-105.
93. Jause B. J. H., Pretorius I. S., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42, 878-883.
94. Rendleman J. A., (1996), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 24, 129-137.
95. Robyt J., French D., (1993), *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 451-467.