

Описание физико - биохимических свойств нового фермента 15-й семьи гликозил-гидролаз гриба *MUCELIOPHTHORA THERMOPHILA*

Волков П.В., Волчок А.А., Доценко А.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им.А.Н. Баха РАН

Глюкоамилаза (альфа-1,4-глюкан-глюканогидролаза, 3.2.1.3, ГЛА) – глюкозообразующая амилаза, катализирует последовательное высвобождение остатков глюкозы от невосстанавливающего конца альфа-1,4-поли- или олигоглюкозидов. Глюкоамилазы относятся к 15-й семье гликозил-гидролаз (GH15) и являются известными ферментами, катализирующими гидролиз крахмала, амилозы, амилопектина, пуллулана и мальтозы, причем глюкоза является конечным продуктом ферментативного гидролиза всех перечисленных субстратов, поэтому ГЛА имеет большой интерес в промышленности и прикладной биотехнологии.

Впервые из гриба *M.thermophila* методами белковой хроматографии была выделена ГЛА с молекулярной массой 68 кДа и значением pI 3,8, которые определены методами ПААГ электрофореза и изоэлектрофокусированием, соответственно. Экспериментально установлено, что в отличие от ГЛА, выделенных из грибов рода *Aspergillus* и *Penicillium*, с рН и температурным оптимумами действия фермента равными 4,0-4,5 и 55-60°C соответственно, новая ГЛА проявляла максимум активности по отношению к крахмалу при рН 5,5 и 70°C соответственно, что, вероятно, связано с термостабильным происхождением грибного штамма.

Методом молекулярно-массового распределения (ММР) был подтвержден экзо-деполимеразный механизм действия ГЛА на специфический субстрат. При этом, в процессе гидролиза крахмала наблюдалось уменьшение площади пика, соответствующего крахмалу, без изменения времени его удерживания, при одновременном увеличении площади пика, отвечающего низкомолекулярному продукту реакции – глюкозе.

Модифицированным методом Шомоди-Нельсона была исследована удельная активность очищенной ГЛА по следующему кругу субстратов: крахмал (25 ед/мг), амилоза (7,8 ед/мг) и амилопектин (5,5 ед/мг). Оказалось, что значения удельных активностей изучаемого фермента почти в два раза превышали значения, например ГЛА, выделенной из гриба *P.verruculosum*, что, вероятно, говорит о более высокой специфичности фермента к субстрату и каталитической активности.

Таким образом, фермент ГЛА *M.thermophila* по эффективности и биохимическим свойствам является перспективным биокатализатором, на основе которого методами генной инженерии и микробиологии будут получены штаммы продуценты, экспрессирующие изучаемый фермент в значительном количестве для дальнейшего изучения.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (Соглашение 14-14-00881).