ЦИКЛОМАЛЬТОДЕКСТРИН ГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗА,
ГАЛОФИЛЬНОГО БАЦИЛЛА

М. О. АДАМЯН, В. А. АБЕЛЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Впервые обнаружена ВВВцикломальтодекстрин глюканотрансфераза у галофильного бацилла. Фермент очищен до электрофоретически гомогенного состояния осаждением его на полимере смеси альфа- и бета-циклодекстринов с последующей ионообменной и гель-проникающей хроматографией. Определены оптимальные условия проявления каталитической активности и некоторые биохимические свойства фермента.

Цикломальтодекстринի մուս առաջին անգամ հայտնաբերվել է ցիկլոմալտոդեքստրինի գլյուկոսիլտրանսֆերազ ֆերմենտը: Ֆերմենտը մաքրվել է մինչև էլեկտրոֆորետիկ համոգենուս վիճակ՝ ալֆա- և բետա- ցիկլոդեքստրինների խառնուրդի պոլիմերի վրա նստեցմամբ և խոն-փոխմանակալին ըրամատոգրաֆիայի և գել-ֆիլտրացիայի օգնությամբ: Արդշվել են ֆերմենտի կատալիտիկ ակտիվության համար յուրաքանչյուր պայման-ները, ինչպես նաև որոշ կենսաքիմիական հատկություններ:

Among the halophilic bacilli the cyclomalto-dextrin glucanotransferase (CGTase) was identified in the first time. The enzyme was purified to an electrophoretically homogeneous state using cyclodextrin polymers as affinity supporters followed by chromatography on DEAE-Coyoperl and gel-filtration on Sephadex G-150. Several biochemical and physico-chemical properties of the enzyme obtained have been studied.

Галофильный бацилл - цикломальтодекстрин глюканотрансфераза - циклодекстрины

Цикломальтодекстрин глюканотрансфераза (1,4-альфа-Д-глюкан 4-альфа-Д-(1,4-альфа-Д-глюкано)-трансфераза, циклизирующая, КФ 2.4.1.19, ЦГТ-аза) способна осуществлять по крайней мере три различные реакции: внутримолекулярное и межмалекулярное трансгликозилирование, а также гидролиз крахмала или циклодекстринов (ЦД) [10].

Все известные до настоящего времени продуценты ЦГТ-азы принадлежат к мезофильным, термофильным и алкалофильным бактериям [1-3].

В настоящей работе приведены основные свойства ЦГТ-азы из галофильного бацилла.

Материал и методика. В работе использовали азробную спорообразующую галофильную бактерию *Vacillus* sp. Г-177 из коллекции культур микроорганизмов Института микробиологии НАН Армении. Культуру выращивали в глубинных условиях при 37° в течение 48 ч на питательной среде следующего состава (г/л): картофельный крахмал-20,0; пептон-10,0,

дрожжевой экстракт-1,0; NaCl-150,0; KCl-2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -20,0; цитрат натрия-3,0; pH 7,0-7,2.

Для концентрирования фильтрата культуральной жидкости: использовали ультрафильтрационные мембраны на порых волокнах AP-0,2 с фильтрующей способностью 15 кД.

Циклизирующую активность определяли метилоранж-мальтотриозным методом [8]. За единицу активности принимали количество фермента, которое продуцировало 1 мкмоль ЦД в мин. Декстрицизирующую активность определяли согласно описанному методу [3]. За единицу активности принимали количество фермента, которое за 10 мин в заданных условиях реакции конвертирует 50% крахмала.

Белок определяли по Лоури [7]. Гомогенность фермента проверяли электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ 7,5%) с Ds-Na [6]. Окрашивание белковой полосы проводили Кумасси бриллиантового-голубым G-250 ("Sigma", США).

Аминокислотный состав ЦГТ-азы определяли на аминокислотном анализаторе ААА 339 фирмы "Mikrotechna" (Чехословакия) после гидролиза препаратов 6N HCl в течение 24ч при 105°.

Приготовление полимеров ЦД проводили согласно описанному методу [4].

Результаты и обсуждение. Для первичной аффинной очистки ЦГТ-азы использование полимеров из чистых альфа-, бета- или гамма-ЦД не дало достаточно удовлетворительных результатов по специфическому связыванию фермента как в количественном отношении, так и по прочности. ЦГТ-аза десорбировалась простым промыванием теплой водой.

Наилучшие результаты получены с использованием полимера смеси альфа- и бета-ЦД, который отличался высокой связывающей способностью. Прочность и селективность полученных комплексов очень высокие - десорбция ЦГТ-азы не наблюдалась даже при промывании носителя 1M раствором NaCl.

Элюция была возможна только в присутствии альфа- или бета-ЦД. Полученный элюат диализовали против водопроводной воды, концентрировали ультрафильтрацией и пропускали через колонку с ДЭАЭ-тойоперлем 650 M (2x20 см). Элюирование белков проводили линейным градиентом раствора альфа-ЦД (0-10 мМ) в 0,01 M фосфатном буфере (pH 7,0). Объединенные активные фракции диализовали против дистиллированной воды и концентрировали. Дальнейшую очистку осуществляли гелефильтрацией на сефадексе G-150 (2x50 см).

Полученная ЦГТ-аза оказалась гомогенной по данным анализов на Ds-Na-ПААГ и гелефильтрации на Биогеле Р-150 в присутствии 0,1% Ds-Na.

Результаты очистки суммированы в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика ЦГТ-азы галофильного штамма G-77 на разных стадиях ее очистки.

Стадии	Общий белок, мг	Общая активность, ед	Выход, %	Специфическая активность, ед/мг белка	Степень очистки
Культуральная жидкость	722	1600	100	2,2	1,0
Адсорбция на полимере альфа- и бета-ЦД (1.1)	14,6	1200	75,5	82,0	37,3
Хроматография на ДЭАЗ-топосорле	6,3	860	54,1	136,0	62,0
Гель-фильтрация на Сефадексе G-150	5,1	775	48,7	152,0	69,1

Изученный фермент свою максимальную декстринизирующую активность проявлял в пределах pH 5,9-9,0 с оптимумом при pH 7,0 (табл. 2). Однако при 50° и в течение 1,5ч ЦГТ-аза практически полностью инактивировалась в диапазоне pH 4,5-5,5. Она проявляла высокую стабильность только в узком интервале pH, 6,5-7,5.

Таблица 2. Влияние pH на активность ЦГТ-азы галофильного бацилла (смесь 2% крахмала и фермента (10:1) в 0,01M буферном растворе инкубировали при 50° в течение 5 мин)

pH	Активность, % от максимальной
5,95	98,6
6,85	100
7,95	97,2
8,25	97
8,55	90,6
8,8	82,9
9,25	79,8

В зависимости от температуры активность фермента существенно не менялась - она практически одинакова в пределах температур 45-75° с оптимумом при 60-62° (табл. 3). ЦГТ-аза

достаточно стабильна при температурах до 55° однако при более высоких температурах происходит ее резкая инактивация.

В отличие от большинства известных ЦГТ-аз, стабильность которых в значительной степени зависит от присутствия ионов Ca^{+2} и ингибируется ионами железа, меди или бария [3, 5, 9], на данный фермент стабилизирующее влияние оказывают ионы Fe^{+3} , Co^{+2} , Ba^{+2} , а ингибирующее - Zn^{+2} .

Таблица 3. Влияние температуры на активность ЦГТ-азы галофильного бацилла (смесь 1 мл 2% крахмала (рН 7,0) и 0,1 мл ферментного раствора инкубировали при различных температурах в течение 10 мин).

Температура, °С	Активность от максимальной, %
41	87,6
46	93,2
51	96
56	98
62	100
66	99,3
70	99,1
76	96,3

Ионы Mn^{+2} , Mg^{+2} и Ca^{+2} практически не проявляют никакого эффекта (табл 4).

Изучение аминокислотного состава ЦГТ-аз из галобацилла в целом не выявило каких-либо существенных отклонений от таковых, идентифицированных для ферментов из мезофильных, алкалофильных и термофильных бацилл [1], за исключением высокого содержания цистеина.

Определение K_m и V_{max} дало следующие результаты: $2,5 \pm 0,03$ мг/мл и $0,66 \pm 0,01$ мг/мин по крахмалу.

Очищенная ЦГТ-аза из 10% крахмала образовала бета-ЦД с выходом 27%, а в присутствии 5% толуола или 1% трихлорэтилена - 52%.

Изложенные данные выявляют ряд характерных свойства ЦГТ-азы, продуцируемой галофильным штаммом спорообразующих бактерий.

Таблица 4. Влияние различных ионов металлов на активность ЦГТ-азы (фермент диализовали против дистиллированной воды в течение 24ч и инкубировали в водном растворе ионв. рН 7.0, при 500 30 мин)

Добавки	Концентрация, мМ	Остаточная активность, %
Без добавки	-	100
MnCl ₂	1,0	100,8
CaCl ₂	1,0	101,6
MgCl ₂	1,0	101,8
ZnCl ₂	1,0	67,8
FeCl ₃	0,5	102,8
CuCl ₂	0,5	98,9
CoCl ₂	0,5	102,4
BaCl ₂	0,5	102,3

Наиболее отличительной особенностью ее является высокая продуктивность бета-ЦД. С другой стороны, факт образования ЦГТ-азы галофильными бактериями имеет теоретическое значение и расширяет области поиска этих ферментов.

Авторы выражают признательность сотрудникам Института микробиологии НАН Армении Балаяну АМ и Арутюкян АЕ за содействие при выполнении данной работы.

Выполнение данной работы частично финансировалось грантами МНО (Сороса) RY 1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3512.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аветисян А.В., Авалян Э.Г., Мелкумян А.Г., Балаян А.М., Узунян Л.В., Гаспарян А.В. Биохимия, 57, 430-437, 1992.
2. Аветисян А.В., Балаян А.М., Авалян Э.Г., Манукян Л.С., Узунян Л.В. Биохимия, 57, 438-443, 1992.
3. Аветисян А.В., Гаспарян А.В., Авалян Э.Г., Африкян Э.Г. Биохимия, 56, 1578-1582, 1991.
4. Аветисян А.В., Ямамото Т., Африкян Э.Г. Биохимия, 59, 778-781, 1994.
5. Bonato L. J., Backer D.P., Villetto J.P., Sicard P.J., Bourdani S.J. Biotechnol and Appl Biochem, 15, 48-58, 1992.
6. Lammily V.K. Nature, 227, 680-685, 1970.
7. Lowry O.H., Rosenbrough N.G., Farr F.L., Randall R.J. J Biol. Chem, 193, 265-275, 1951.
8. Makela M.J., Korpele T.K. Biochem Biophys. Methods, 15, 307-318, 1988.
9. Sazian J.G., Park Y.K. Rev. Microbiol, 23, 129-132, 1992.
10. Ercel J. Cyclodextrins and their inclusion complexes. 296, Budapest, 1982.

Поступила 21. X 1994