

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ЦИКЛОМАЛЬТОДЕКСТРИН ГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ *BACILLUS HALOPHILUS*

В.А. АБЕЛЯН*, К.Б. АФЯН*, Л.С. МАНУКЯН*, М.О. АДАМЯН**

*Институт микробиологии ИАН,

**Республиканский Центр депонирования микробов ИАН и
Министерства образования и науки Армении, 378510, г. Абовян

Очищенная до гомогенного состояния цикломальтодекстрина глюкозотрансфераза (ЦГТ, КФ 2.4.1.19) из *Bacillus halophilus* ИММА-3849 была подвергнута фотоинактивации и модифицированию диэтилпирокарбонатом в присутствии салицина, акарбозы и полимера β -циклодекстрина (ЦД). Установлено, что в каталитическом акте ЦГТ существенное участие принимают карбоксильная и две имидазольные группы гистидина, которые выполняют роль нуклеофильно-электрофильной пары.

Bacillus halophilus ԻՆՄԻԱ-3849 շտամի մինչև համաժեռ վիճակ մաքրված ցիկլոմալտոդեքստրին գլյուկանոտրանսֆերազը (ԶԳՏ, ՖԿ 2.4.1.19) ենթարկվել է ֆոտոինակտիվացիայի և դիէթիլպիրոկարբոնատով մոդիֆիկացիայի սալիցինի, ակարբոզի և β -ցիկլոդեքստրինի (ՑԴ) պոլիմերի ներկայությամբ: Հաստատվել է, որ ԶԳՏ-ի կատալիտիկ ակտում էական նշանակություն ունեն հիստիդինի կարբոքսիլ և երկու իմիդազոլ խմբերը, որոնք կատարում են նուկլեոֆիլ-էլեկտրոֆիլի գույզի դեր:

The photoinactivation and modification by diethylpyrocarbonate of the homogeneous cyclomaltoextrin glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) produced by *Bacillus halophilus* INMIA-3849 have been developed in the presence of salicin, acarbose and β -cyclodextrin (CD) polymer. The carboxyl and two imidazole groups of histidine, playing the role of nucleophilic-electrophilic pair, are very important in the catalytical action of CGTase.

Bacillus halophilus - цикломальтодекстрин глюкозотрансфераза -
диэтилпирокарбонат

Активный центр цикломальтодекстрин глюкозотрансфераз (ЦГТ, КФ 2.4.1.19) состоит из двух отдельных участков - акцепторного и донорного [2,3,6,13] и имеет большую гомологию с α -амилазами [12,14,16,18]. Аналогично α -амилазам ЦГТ состоит из четырех глобулярных участков, из которых А и В идентичны таковым α -амилаз, в то время как участки С и D являются характерными только для ЦГТ [19,23]. В циклизации мальтоолигосахаридов важную роль играет COOH-концевой участок фермента [17,26,27], однако немаловажное значение имеет и NH₂-участок [15].

Необходимым условием для циклизации является взаимодействие субстрата с обоими участками одновременно [5].

В развитие наших предыдущих работ, касающихся характерных особенностей новых ЦГТ из галофильных бактерий [3,5], в настоящей статье обобщены результаты изучения активного центра ЦГТ *Bacillus halophilus* ИММА-3849 методами фотоокисления и модифицирования диэтилпирокарбонатом (ДЭПК).

Материал и методика. В качестве продуцента ЦГТ использовали культуру *B. halophilus* ИНМИА-3849, выращивание которой осуществляли по ранее описанной методике [3].

Очистка фермента и его основные характеристики описаны в предыдущей работе [3].

Фотоокисление ЦГТ осуществляли при разных значениях pH и температуры в присутствии 25 мкМ метиленовой сини при 20°, освещая пробы лампой дневного света мощностью 150 Вт на расстоянии 10 см. Контролем служили пробы с той же концентрацией фотосенсибилизатора, находящиеся в темноте, а также образцы, освещавшиеся тем же источником света, но в отсутствие метиленовой сини [8,9].

Модификацию ДЭПК осуществляли по методу Майсса [24]. Для этого к 20,2 мкМ (1,13 мг/мл) раствора ЦГТ в 0,02 М фосфатном буфере, pH 6,2, содержащем 1 мМ CaCl₂, добавляли 100-кратный молярный избыток ДЭПК в абсолютном этаноле и регистрировали прирост поглощения при 240 нм, характеризующий образование N-этоксиформилимидазола.

В экспериментах в присутствии эффекторов концентрации салицина и акарбозы равнялись 5 мМ, а количество полимера β-ЦД - 2 мг/мл. Для расчета числа модифицированных остатков использовали коэффициент молярной экстинкции N-карбокситоксигистиллина, равный 3200 М⁻¹ см⁻¹ [25], по формуле [29]:

$$n = \Delta A_{240} / l \cdot 20,2 \cdot 10^{-4} \cdot 3200,$$

где ΔA_{240} - это [$A_{240}(\text{с. цгт.}) - A_{240}(\text{б. цгт.})$] через 40 мин; $l \cdot 10^{-4}$ - ширина реакционной ячейки, см; 20,2 · 10⁻⁴ - молярная концентрация ЦГТ.

Реактивацию модифицированной ЦГТ осуществляли добавлением 0,5 М раствора гидроксиламина (pH 7,0).

Циклизирующую активность ЦГТ определяли метилоранж-малъюттриозным методом [22]. За единицу активности принимали количество фермента, которое продуцировало 1 мкмоль ЦД в 1 мин в условиях эксперимента. Декстринизирующую активность определяли согласно описанному методу [4]. За единицу активности принимали количество фермента, которое за 10 мин в заданных условиях реакции конвертировало 50% крахмала.

α-ЦД специфическую активность идентифицировали с применением метилоранжа [20]. Реакционную смесь (3 мл), содержащую 0,6 мл 5%-ного крахмала в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,0), 0,1 мл 1 мМ метилоранжа в том же буфере, 2 мл того же буфера и 0,3 мл ферментного раствора, инкубировали при 40° в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 0,15 мл 6N HCl, оставляли при 15-16° в течение 30 мин; экстинкцию определяли на спектрофотометре СФ-46 при 505 нм.

β-ЦД специфическую активность определяли по известному методу с применением фенолфалеина [28], количество различных ЦД - методом ВЭЖХ в ранее описанных условиях [3]. Белок определяли по Лоури [21], используя БСА в качестве стандарта.

Приготовление полимера β-ЦД проводили согласно ранее описанному методу [1].

В работе использовали крахмал, ДЭПК и ЦД производства "Seigra" (Германия), салицин - "Aldrich" (США), акарбозу - "Bayser" (Германия), а также реактивы отечественного производства.

Результаты и обсуждение. 1. Фотоокисление функциональных групп ЦГТ в присутствии метиленовой сини. Типичной реакцией на имидазольную группу гистидина является ее фотоокисление в присутствии метиленовой сини, играющей роль фотосенсибилизатора [9]. Фотоокисление приводит к разрыву гетероцикла имидазола и инактивации фермента. Результаты экспериментов показали, что ЦГТ подвергается интенсивной фотоинактивации (рис.1). С увеличением pH, т.е. с уменьшением концентрации H⁺-ионов в среде, скорость фотоинактивации возрастает, что свидетельствует о присутствии имидазольной группы гистидина, которая, как известно, выполняет роль "ловушки" протонов [7]. Такими свойствами ни фенольное кольцо тирозина, ни индольная группа триптофана, которые также способны фотоокисляться, но с меньшей

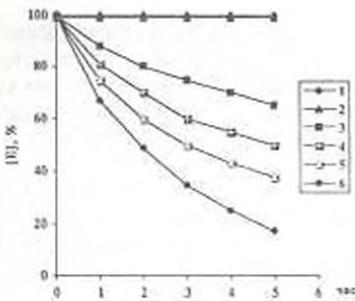


Рис. 1. Инактивация ЦГТ *B. halophilus* ИИМИА-3849 фотоокислением при различных рН. 1 - без метиленовой сини в темноте при рН 7,0; 2 - с метиленовой синью на свету; 3 - инактивация при рН 5,0; 4 - рН 6,0; 5 - рН 7,0; 6 - рН 9,0.

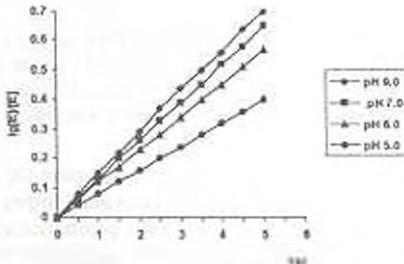


Рис. 2. Изменение $\lg[E_0]/[E]$ во времени. $[E_0]$ и $[E]$ - исходная и в данный момент времени процентная концентрации фермента соответственно, определяемые по начальной скорости реакции.

Таблица 1. Изменение pK_2 активной группы ЦГТ *B. halophilus* ИИМИА-3849 в зависимости от температуры при фотоокислении

Температура, К	pK_2
293	5,5
303	5,7
313	5,8
318	5,9

2. Модификация имидазольной группы гистидина с помощью ДЭПК.

Для подтверждения предположения о возможности участия имидазольной группы в каталитическом акте ЦГТ было исследовано влияние ДЭПК на активность фермента. Выявлено, что этоксикарбонилирование этой группы приводит к быстрой инактивации ЦГТ (рис.3). Однако данный эффект, возможно, связан также с реакцией фенольной группы тирозина и/или с ϵ -NH₂-группой лизина, а также индольным кольцом триптофана и SH-

скоростью, не обладают [10,11].

При высокой концентрации в среде Н⁺-ионов имидазольная группа положительно заряжена, что является препятствием для отдачи электронов под действием фотонов света. С увеличением рН среды имидазольная группа отдает протоны, пропорционально растет скорость фотоокисления группы. Зависимость $\lg[E_0]/[E]$ от времени t является линейной (рис.2) и процесс фотоинактивации относится к реакции первого порядка. При этом точка пересечения прямых на кривой $\lg k = f(\text{pH})$ находится при рН 6,3, соответствующей pK_2 имидазольной группы.

Выявлено также, что с увеличением температуры pK_2 возрастает (табл.1).

Воспользовавшись этими данными, из кривой зависимости pK_2 от $1/T$ мы рассчитали теплоту ионизации искомой группы. Она равнялась 7270 ± 200 кал/моль и соответствовала теплоте ионизации имидазольной группы гистидина.

группой цистеина [7]. Поэтому для точного установления причин инактивации фермента были сняты спектры поглощения модифицированного фермента при различных значениях длины волны, так как известно, что образование карбэтоксигистидина приводит к увеличению поглощения при 242 нм, а более медленная модификация фенольного остатка тирозина - к уменьшению поглощения при 278 нм [11]. Из полученных нами результатов видно, что ДЭПК модифицирует преимущественно имидазольное кольцо гистидина, хотя имеет место также медленное окисление фенольного остатка тирозина (рис.4).

Известно также, что если инактивация фермента обусловлена этоксикарбонилированием имидазольной группы гистидина, то с помощью деацилирования гидроксиламином можно осуществить реактивацию [7], что не наблюдается при модификации SH-группы цистеина и ϵ -NH₂-группы лизина. В нашем случае специфичность ДЭПК к имидазольной группе подтверждается тем, что гидроксиламин реактивирует ЦГТ примерно на 75% (рис.3). Следует отметить, что при модификации снижаются одновременно как декстринизирующая, так и циклизирующая активности.

Установлено также, что глюкоза, мальтоза, мальтотриоза и салицин являются конкурентными ингибиторами для изучаемого фермента, приводящими к уменьшению циклизирующей, но увеличивающими декстринизирующую активности. В их присутствии V_{max} реакции не меняется, однако значение K_m увеличивается с повы-

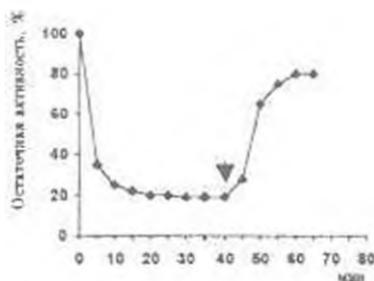


Рис.3. Динамика инактивации ЦГТ при модификации ее с помощью ДЭПК. Стрелка указывает на начало реактивации под действием гидроксиламина.

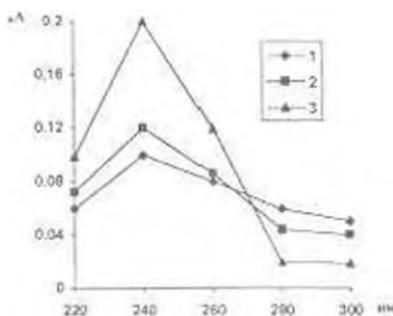


Рис.4. Изменение спектров поглощения ЦГТ под действием ДЭПК. (20,2 мкмоль ЦГТ; 2,5 мМ ДЭПК; pH 6,2, 20°). 1 - через 10 мин; 2 - 20 мин; 3 - 40 мин.

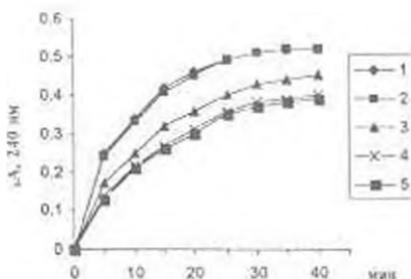


Рис.5. Изменение оптической плотности раствора ЦГТ при 240 нм в зависимости от продолжительности действия ДЭПК. (20,2 мкмоль ЦГТ; 2,5 мМ ДЭПК; pH 6,2; 30°). 1 - только ЦГТ; 2 - ЦГТ с 5 мМ салицином; 3 - ЦГТ с 5 мМ акарбозой; 4 - ЦГТ с 5 мМ салицином и 5 мМ акарбозой; 5 - ЦГТ в сочетании с 2 мг/мл полимера β-ЦД.

шением их концентрации в среде. С другой стороны, в присутствии акарбозы происходит одновременное уменьшение значения как V_{max} , так и K_m (табл. 2), т.е. акарбоза является бесконкурентным ингибитором. На основании этого салицин, акарбоза и полимер β -ЦД были применены в качестве защитных агентов при модификации. Показано, что применение только салицина не дает никакого эффекта, в то время как полимер β -ЦД, а также акарбоза и ее смесь с салицином несколько уменьшают степень этоксиформилирования (рис.5).

Таблица 2. Влияние различных ингибиторов на ЦГТазную активность

Ингибитор/ эффектор	Тип ингиби- рования	K_m , мг/мл	V_{max} , мг/мин	Диспро- порцио- нирова- ние	Модификация с помощью ДЭПК		
					модифи- цирован- ные гис- тидило- вые остатки	защищен- ные гис- тидило- вые остатки	остаточ- ная актив- ность, %
без добавок	-	2,50	0,660	±	8	0	21,0
Глюкоза	конкурент	2,45	0,660	+++	7,9	0	22,0
Мальтоза	конкурент	2,43	0,662	+++	7,9	0	24,1
Мальтотриоза	конкурент	2,43	0,662	+++	7,8	0	25,0
Салицин	конкурент	2,42	0,660	++++	8,0	0	30,0
Акарбоза	бесконк.	0,30	0,092	±	7,0	1	50,0
Полимер β -ЦД	не опре- деляли	не опре- деляли	не опре- деляли	не опре- деляли	6,0	2	95,0
Акарбоза+ салицин	не опре- деляли	не опре- деляли	не опре- деляли	не опре- деляли	5,9	2	97,0
Акарбоза+ β -ЦД	не опре- деляли	не опре- деляли	не опре- деляли	не опре- деляли	6,0	2	95,3

Примечание: (+) - слабое диспропорционирование, (±) - некоторое подавление диспропорционирующей активности.

При этом если в присутствии салицина, как и без него, модифицируются 8 остатков гистидина, то при акарбозе и ее смеси с салицином - 7 и 6 остатков соответственно (рис.6), т.е. они способны защищать 1 и 2 имидазольные группы гистидина соответственно.

Защитный эффект 2-х гистидильных групп достигается также при применении β -ЦД с акарбозой и полимера β -ЦД. Если после модификации с помощью ДЭПК ЦГТ сохраняет всего около 21% исходной активности, то в случае с салицином - около 30%, акарбозой - 50%, комбинацией акарбоза + салицин - 97,0%, полимером β -ЦД - 95% (рис.7), т.е. существует прямая связь между защищенными гистидиловыми остатками и остаточной активностью ЦГТ (рис.8). Два гистидиловых остатка, защита которых приводит к сохранению активности, могут быть расположены в активном центре ЦГТ.

Таким образом, тот факт, что салицин, связывающийся с акцепторным центром, сам по себе не защищает гистидиловые группы при модифицировании ЦГТ с помощью ДЭПК, а в сочетании с акарбозой, которая защищает 1 гистидиловый остаток, защищает 2 такие группы.

подтверждает ранее сделанное предположение о присутствии в активном центре ЦГТ донорного и акцепторного участков [2,3,6].

Тот факт, что защита одного гистидилового остатка при модифицировании ЦГТ с помощью ДЭПК на 50% сохраняет необходимую специфическую активность, а двух – до 97,0%, указывает на то, что и каталитическом акте ЦГТ важную роль играют два гистидиловых остатка, которые, видимо, локализованы в донорном подцентре. При этом в каталитическом акте могут участвовать или оба остатка одновременно, или же только один из них. В последнем случае, когда донорный подцентр не находится в акцепторно-индуцированной конформации, акарбоза может взаимодействовать с ним двумя типами эквипотенциальной связи, но при каждом из них защищался бы только один гистидиловый остаток. В присутствии акцептора акарбоза может связываться одним единственным, более эффективным путем, приводящим к защите обоих гистидиловых остатков в активном центре и сохраняющим полную ферментативную активность при модификации, т.е. акцепторный центр имеет предварительно связывающую функцию, приводящую к изменениям конформации всего активного центра и ориентирующую связывание донора в положении, необходимом для трансгликозилирования.

Вероятно, в каталитическом центре ЦГТ карбоксильная и имидазольная группы выполняют роль нуклеофильно-электрофильной пары, под действием которой происходит разрыв связи С-О с оттягиванием электронов к имидазольной группе и их уходом от карбоксилат-

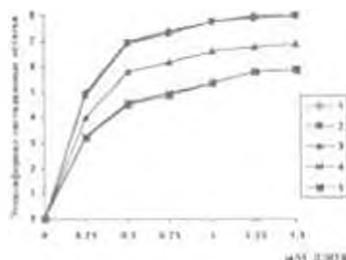


Рис. 6. Определение гистидиловых остатков в модифицированной ЦГТ через 40 мин при 30°. Условия см. на рис. 4 и в тексте. 1 - только ЦГТ; 2 - ЦГТ с 5 мМ салицином; 3 - ЦГТ с 5 мМ акарбозой; 4 - ЦГТ с 5 мМ салицином и 5 мМ акарбозой; 5 - ЦГТ в сочетании с 2 мг/мл полимером β-ЦД

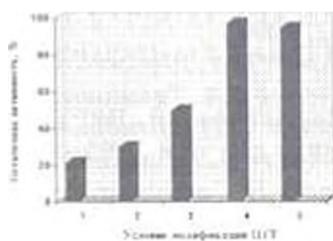


Рис. 7. Остаточная активность ЦГТ через 40 мин модификации при 30°. Условия см. на рис. 4 и в тексте. 1 - ЦГТ только (20,2 мкмоль); 2 - ЦГТ с салицином (5 мМ); 3 - ЦГТ с акарбозой (5 мМ); 4 - ЦГТ с салицином (5 мМ) и акарбозой (5 мМ); 5 - ЦГТ с полимером β-ЦД (2 мг/мл).

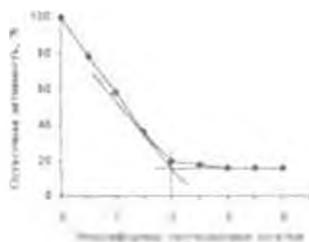


Рис. 8. Зависимость остаточной активности ЦГТ от количества восстановленных гистидиловых остатков. Данные пересчитаны от кривой 1 рисунка 6.

Авторы выражают признательность сотрудникам лаборатории биотрансформации Института микробиологии НАН Армении В.С. Меликсетян и С.Я. Балаян за техническую помощь при выполнении данного исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абелян В.А., Ямамото Т., Африкян Э.Г. Биохимия, 59, 778-787, 1994.
2. Абелян В.А., Ямамото Т., Африкян Э.Г. Биохимия, 59, 1122-1129, 1994.
3. Абелян В.А., Адамян М.О., Абелян Л.А. Биохимия, 60, 898-904, 1995.
4. Абелян В.А., Гаспарян А.В., Авакян З.Г., Африкян Э.Г. Биохимия, 56, 1578-1582, 1991.
5. Абелян В.А., Адамян М.О., Абелян Л.А., Балаян А.М., Африкян Э.Г. Биохимия, 60, 891-897, 1995.
6. Абелян В.А., Афан К.Б., Авакян З.Г., Мелкумян А.Г., Африкян Э.Г. Биохимия, 60, 1600-1608, 1995.
7. Буник В.И., Гомазкова В.С. Биохимия, 52, 1235-1247, 1987.
8. Жеребцов Н.А., Корнеева О.С., Тертычная Т.Н. Биохимия, 60, 1253-1262, 1995.
9. Ковалева И.А., Дорошко А.И., Коган З.С. Биохимия, 49, 1253-1262, 1984.
10. Кочетов Г.А. Тиампиновые ферменты. Наука, М., 74, 1978.
11. Лосева Л.П., Бендианишвили М.В., Шатилов В.Р., Шубин В.В., Кретович В.Л. Биохимия, 51, 840-849, 1986.
12. Bender H. Carbohydr. Res., 209, 145-153, 1991.
13. Bovetto L.J., Villette J.R., Fontain I.F., Sicard P.J., Bouquetlet S.J.L. Biotechnol. Appl. Biochem., 15, 59-68, 1992.
14. Dua R.D., Kochhar S. Mol. Cell. Biochem., 66, 13-20, 1985.
15. Fujitwara S., Kakihara H., Woo K., Lejeune A., Kanemoto M., Sakaguchi K., Imanaka T. Appl. Environ. Microbiol., 58, 4016-4025, 1992.
16. Hoschke A., Laszlo E., Hollo J. Carbohydr. Res., 81, 145-156, 1980.
17. Kimura K., Kataoka S., Ishii Y., Takano T., Kobayashi S. Biochem. Biophys. Res. Commun. 161, 1273-1297, 1989.
18. Kita Y., Sakaguchi S., Nitta Y., Watanabe T. J. Biochem., 92, 1499-1504, 1982.
19. Kubota T., Imanaka T. J. Gen. Microbiol., 135, 1521-1528, 1989.
20. Lejeune A., Sakaguchi K., Imanaka T. Annl. Biochem., 181, 6-11, 1989.
21. Lowry O.H., Rosenbrough N.G., Farr A.L., Randell R.J. J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
22. Makela M.J., Korpela T.K. Biochem. Biophys. Methods. 15, 307-318, 1988.
23. Matsuura Y., Kusunoki M., Harada W., Kakudo M. J. Biochem., 95, 697-702, 1984.
24. Miles R.W. Methods Enzymol., 47, 431-442, 1978.
25. Ovadi J., Libor S., Elodi P. Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung., 2, 455-458, 1967.
26. Svensson B., Clarke A.J., Svensson I. Carlsberg Res. Commun., 48, 517-527, 1983.
27. Svensson B., Jespersen H., Sierks M.R., MacGregar E.A. Biochem. J.,

264, 309-311, 1989.

28. *Vikmon M.* In: Proceedings of the first international symposium on cyclodextrins (Szejtli, J., ed.), D.Reidel, Budapest, 69-74, 1982.
29. *Villette J.R., Sicard P.J., Bouquetlet S.J.-L.* Biotechnol. Appl. Biochem., 15, 69-79, 1992.

Поступила 10.V.97

Биолог. журн. Армении. 3-4 (50), 1997

УДК 579.871.579.253.4

**ПЕРЕНОС И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ФЕП-КАРБОКСИЛАЗЫ
ESCHERICHIA COLI В КЛЕТКАХ КОРИНЕФОРМНЫХ БАКТЕРИЙ**

Н.А. ОГАНЕСЯН, М.Г. ГЕВОРКЯН, М.Б. ЧИТЧЯН, Э.Л. АГАБЕКЯН,
Г.Г. ОГАПЕЗОВА, С.В. КАЖОЯН, Н.С. АВЕТИСЯН, В.А. САКАНЯН

НИИ "Биотехнология", 375054, Ереван

Сконструирована гибридная плазмида рРС6, содержащая ген ФЕП-карбоксилазы *Escherichia coli* и способная реплицироваться в клетках коринеформных бактерий. Методом электропорации получены трансформанты *Brevibacterium flavum* и *Brevibacterium lactofermentum*, содержащие плазмиду рРС6. В клетках полученных трансформантов активность ФЕП-карбоксилазы повышается почти в два раза. В условиях ферментации штамма *B.lactofermentum* 150/рРС6 наблюдается низкий уровень сегрегационной стабильности плазмиды рРС6. Линзинсинтезирующая активность рекомбинантного штамма 150/рРС6 сохраняется на уровне синтеза линзина родительским штаммом.

Կառուցվել է рРС6 հիբրիդային պլազմիդը, որը կրում է *E. coli*-ի ՖԵՊ-կարբոքսիլազի գենը և ընդունակ է կրկնօրինակվել կորինեֆորմալտերիոսների բջիջներում և լեկտրապորացիայի եղանակով ստացվել են *B. flavum*-ի և *B.lactofermentum* ի րժՏԵ պլազմիդ պարունակող տրանսֆորմանտները: Ստացված տրանսֆորմանտների բջիջներում ՖԵՊ-կարբոքսիլազի ակտիվությունը բարձրացել է երկու անգամ: Ֆերմենտացիայի պայմաններում *B.lactofermentum* ի 150/րժՏԵ շտամի րժՏԵ պլազմիդի սեգրեգացիոն կայունությունը ցածր է: *B.lactofermentum* ի 150/րժՏԵ ռեկոմբինանտ շտամը լինզին սինթեզելու ունակությամբ չի տարբերվում ծնողական ծիւց:

The hybrid plasmid рРС6 was constructed. The plasmid contained the PEP-carboxylase gene of *E.coli* and was able to replicate in coryneform bacteria. By electroporation method the transformants of *B.flavum* and *B.lactofermentum* strains with the plasmid рРС6 were obtained. The PEP-carboxylase activity in coryneform transformants was increased twice. At fermentation processes the segregation stability of the plasmid рРС6 in cells of *B. lactofermentum* strain 150/рРС6 was low. The level of lysine synthesis in the recombinant strain 150/рРС6 was not changed.