Биолог. журн. Армении, 3-4 (56), 2004

УДК 577.152.2.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ЦИКЛОМАЛЬТОДЕКСТРИН ГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗ У МИКРОМИЦЕТОВ

А.В. ГАСПАРЯН

Республиканский Центр депонирования микробов НАН Армении, 378510, г.Абовян

The distribution of cyclomalto-dextrin glucanotransferases (CGTase) in different species and genera of micromycetes has been studied. The biosynthesis of CGTase characterizing the representatives of genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Ulocladium*, *Phoma*, *Alternaria*, except *Cladosporium* has been revealed. The CGTases of micromycetes produced from starch β - and γ -cyclodextrins (CD), mainly γ -CD. The optimal values of CGTase catalytic activity for strains *Penicillium chrysogenum* and *Ulocladium botrytis* - the active producers have been determined.

Цикломальтодекстрин глюканотрансфераза – микромицеты-продуценты – циклодекстрин

Цикломальтодекстрин глюканотрансфераза (ЦГТаза, КФ 2.4.1.19) относится к семейству α -амилаз, которые при действии на крахмал одновременно катализируют 4 реакции: циклизацию (внутримолекулярное трансгликозилирование) с образованием циклических олигосахаридов-циклодекстринов (ЦД), состоящих из шести, семи или восьми α -D-глюкозных единиц (α -, β - или γ -ЦД соответственно), диспропорционирование (межмолекулярное трансгликозилирование) с образованием линейных мальтоолигосахаридов, спаривание с дециклизацией молекул ЦД и переноса на акцептор, а также гидролиз крахмала, ЦД и мальтоолигосахаридов [11, 12].

ЦГТазы распространены у различных групп микроорганизмов, среди которых активными продуцентами являются представители рода *Bacillus* и их экстремофильные формы, а также представители родов *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Thermococcus*, *Thermoanaerobacter*, *Brevibacterium*, *Thermus*, актиномицеты рода *Thermoactinomyces* [1].

Установлено, что разные виды микромицетов могут использовать нативные ЦД и их производные для роста [9], однако к настоящему времени продуценты ЦГТаза среди микромицетов не известны.

В данной статье приводятся результаты изучения распространения ЦГТаза и характеристика их у культур разных видов и родов микромицетов.

Материал и методика. Объектами исследований служили культуры разных родов микромицетов из коллекции культур Республиканского Центра депонирования микробов (РЦДМ) НАН Армении, представленные видами: *Penicillium chrysogenum* (2 шт.), *P. melinii* (5 шт.), *P. aurantiogriseum* (13 шт.), *Aspergillus versicolor* (3 шт.), *A. fumigatus* (3 шт.), *Aspergillus sp.* (1 шт.), *Ulocladium botrytis* (2 шт.), *Phoma eupyrena* (1 шт.), *Alternaria sp.* (1 шт.),

Cladosporium macrocarpum (1 шт.), *Cladosporium sp.* (1 шт.).

Для изучения биосинтеза ЦГТаз использовали питательную среду (г/л): пептон – 10,0; NaCl – 5,0; CaCl₂ – 0,1; крахмал – 10,0. Культивирование штаммов микромицетов проводили в колбах Эрленмейера емкостью 250 мл, содержащих 30 мл среды, при 28° в течение 7 сут.

ЦГТазную активность определяли в культуральной жидкости (кж).

Декстринизирующую реакцию определяли по методу Hale, Rawlins [7], циклизирующую реакцию – методами с использованием метилоранжа [6], фенолфталеина [4], бромкрезолового зеленого [8] для определения α-, β- и γ-ЦД. ЦД определяли также методом микроскопирования, с окрашиванием йодным раствором.

Реакцию диспропорционирования в смеси 5%-ного крахмала и сахарозы (1:1) определяли по модифицированному методу [5], продукты межмолекулярного трансгликозилирования – методом ТСХ в системе н-бутанол – этанол – вода (4:3:3), проявитель – водонасыщенный раствор анилинфталата.

Гидролитическую реакцию определяли, используя в качестве субстрата смесь α-, β-, γ-ЦД и крахмала по модифицированному методу [12], количество редуцирующих сахаров – методом Шомодьи- Нельсона [10].

Результаты и обсуждение. Сводные данные о продуцировании ЦГТаз у выборочных типичных штаммов разных видов микромицетов, обобщенные в табл. 1, свидетельствуют о распространении ЦГТаз у родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Ulocladium*, *Phoma*, *Alternaria*, у штаммов *Cladosporium sp.* и *C. macrocarpum* ЦГТаз не обнаружена.

Таблица 1. Распространение ЦГТаз у культур разных видов микромицетов

Виды	Всего испытано штаммов	Продуцируют ЦГТазы		Основной продукт, ЦД
		всего	в т.ч. активных	
<i>Alternaria sp.</i>	1	1	1	β/γ
<i>Aspergillus sp.</i>	1	1	1	β/γ
<i>A.versicolor</i>	3	3	3	β/γ
<i>A.fumigatus</i>	3	3	3	β/γ
<i>Cladosporium sp.</i>	1	0	0	-
<i>C.macrocarpum</i>	1	0	0	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	2	2	2	β/γ
<i>P.melinii</i>	5	5	2	β/γ
<i>P.aurantiigriseum</i>	13	13	1	β/γ
<i>Phoma eupyrena</i>	1	1	1	β/γ
<i>Ulocladium botrytis</i>	2	2	2	β/γ

Все исследованные штаммы *P. chrysogenum*, *P.melinii*, *P.aurantiigriseum*, *Aspergillus sp.*, *A. versicolor*, *A. fumigatus*, *U. botrytis*, *Ph. eupyrena*, *Alternaria sp.* продуцируют ЦГТазы, однако внутри этих видов и штаммов обнаруживается определенная вариабельность ЦГТазной активности.

Выявлено, что ЦГТазы микромицетов образуют из крахмала β- и γ-ЦД, с достаточно высоким выходом β-ЦД, а α-ЦД образуются в незначительном количестве в начальном периоде реакции фермента.

В качестве активных продуцентов ЦГТаз исследованы штаммы *P. chrysogenum* ИНМИА F-12110 и *U. botrytis* ИНМИА F-12037. Результаты ЦГТазной активности у данных продуцентов представлены в табл.2.

Таблица 2. Характеристика ЦГТазной активности у грибных продуцентов

Виды, штаммы	ЦГТазная активность, ед/мл кж		
	декстринизирующая	циклизирующая	гидролитическая
<i>P. chrysogenum</i> ИНМИА F-12110	3,5	1,7	0,25
<i>U. botrytis</i> ИНМИА F-12037	6,0	2,5	0,7

Примечание: ИНМИА - акроним номеров штаммов коллекции культур РЦДМ.

Максимальная ЦГТазная активность (декстринизирующая, циклизирующая и гидролитическая реакции) у микромицетов проявляется в конце роста и для шт. *P. chrysogenum* ИНМИА F-12110 составляет 3,5, 1,7 и 0,25 ед/мл кж соответственно, а для шт. *U. botrytis* ИНМИА F-12037 - 6,0, 2,5 и 0,7 ед/мл кж соответственно. У грибных продуцентов ЦГТазная активность, выраженная в ед/мл кж, находится на уровне таковой известных активных бактериальных продуцентов [2].

Результаты реакции диспропорционирования с применением грибных ЦГТаз показывают, что при использовании в качестве акцептора сахарозы в смеси с крахмалом (1:1) при 30° в течение 24 ч среди продуктов трансгликозилирования обнаруживаются эрлоза, мальтотриоза, мелизитоза, мальтотетраоза и более высокомолекулярные олигосахариды, а также глюкоза, мальтоза, сахароза.

Таким образом, ЦГТазы микромицетов характеризуются всеми свойствами механизма действия этого фермента.

Изучение зависимости ЦГТазной активности от рН показало, что высокая активность у шт. *P. chrysogenum* ИНМИА F-12110 наблюдается в области рН 6,0 - 7,0, оптимальный - 6,0, а у шт. *U. botrytis* ИНМИА F-12037 - в области рН 5,0 - 7,0, оптимальный - 5,5. Высокая каталитическая активность ЦГТаз у обоих штаммов проявляется в пределах температуры 30°-50°, оптимальная 40°.

Литературные данные свидетельствуют о распространении амилолитических ферментов и активных продуцентов α -амилаз, глюкоамилаз среди микромицетов [3], однако на основании наших результатов можно полагать, что усвоение крахмала с биосинтезом ЦГТаз является характерной особенностью представителей разных родов и видов микромицетов. Кроме того, на основании ряда исследований известные микробные продуценты α -амилазы к настоящему времени переименованы и представлены как продуценты ЦГТаз [13]. В этом плане наши результаты по изучению ЦГТаз микромицетов дополняют характеристику их амилолитических ферментов и могут служить объектом для дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда МНТЦ (проект А-092.2).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абелян В.А.* Циклодекстрины: получение и применение, Ереван, 2001.
2. *Абелян В.А., Авакян З.Г., Мелкумян А.Г., Балаян А.М., Узунян Л.В., Гаспарян А.В.* Биохимия, 57, 3 430-437, 1992.
3. *Квеситадзе Г.И.* Грибные и бактериальные амилазы, Тбилиси, 1984.
4. *Кестнер А.И., Вокк Р.А., Панпель К.Э., Лейман Э.М.* Прикл.биохимия и микробиология, 25, 3 425-430, 1989.
5. *Akimaru K., Yagi T., Yamamoto S.* J.Ferment. Bioengin., 71, 1, 63-65, 1991.
6. *Fujiwara S., Kakihara H., Woo K.B., Lejeune A., Kanemoto M., Sakaguchi K., Imanaka T.* Appl.Environ.Microbiol., 58, 12, 4016-4025, 1992.
7. *Hale W.S., Rawlins L.C.* Cereal Chem., 28, 1, 49-58, 1951.
8. *Kato T., Horikoshi K.* Anal.Chem., 56, 1738-1741, 1984.
9. *Oros G.* Biolog.J.Armenia, Special issue: Cyclodextrins, 237-244, 2001.
10. *Somogyi M.J.* J.Biol.Chem., 195, 1, 19-22, 1952.
11. *Tachibana Y., Kuramura A., Shirasaka N., Suzuki Y., Yamamoto T., Fujiwara S., Takagi M., Imanaka T.* Appl.Environ.Microbiol., 65, 5, 1991-1997, 1999.
12. *Terada Y., Sanbe H., Takaha T., Kitahata S., Koizumi K., Okada S.* Appl.Environ.Microbiol., 67, 4, 1453-1460, 2001.
13. *Wind R.D., Liebl W., Buitelaar R.M., Penninga D., Spreinat A., Dijkhuizen L., Bahl H.* Appl.Environ.Microbiol., 61, 4, 1257-1265, 1995.

Поступила 28.IX.2004