

СКРИНИНГ И СЕЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ - ПРОДУЦЕНТОВ ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗ.

Н.Н.Кузнецова, Е.В.Николаева, В.Г.Винтер

*Казанский Государственный Университет, г. Казань, Татарстан
Natalya.Kuznetsova@ksu.ru*

Циклодекстринглюканотрансфераза (ЦГТаз) [(1,4- α -D-глюкан-4- α -(1,4- α глюкано)-трансфераза] (КФ 2.4.1.19) фермент, который осуществляет гидролиз линейных и циклических поли-1,4- α - глюканов, циклизацию и конденсацию олиго-1,4- α - глюканов с образованием α -, β -, γ -циклодекстринов (ЦД), содержащих соответственно 6, 7 и 8 остатков α -D-глюкозы. Как правило, при гидролизе крахмала, амилозы или амилопектина ЦГТазой микроорганизмов образуется смесь всех трех ЦД в различных соотношениях. Поэтому, в зависимости от того, какой вид ЦД преимущественно синтезируется в процессе реакции, ЦГТазы подразделяются на α -, β -, γ - специфичные.

Пристальное внимание исследователей к этим ферментам обусловлено тем, что ЦД обладают уникальной способностью образовывать инклюзивные комплексы с химическими соединениями, которые находят широкое применение в различных отраслях народного хозяйства (J.Szejtli, 1988) Это свойство ЦД может быть использовано при хранении, транспорте, разделении и обнаружении активных веществ; улучшении доставки лекарств в организме, при очистке сточных вод и нахождению вредных веществ в окружающей среде (сенсоры на основе ЦД). Наиболее высокие и универсальные комплексообразующие свойства проявляет β -ЦД, поэтому актуальность вопроса о рентабельном производстве, ориентированном на получение большого количества дешевого продукта, связана с поиском новых продуцентов ЦГТаз, синтезирующих преимущественно β - ЦД.

Известно, что несмотря на широкое распространение продуцентов ЦГТаз в природе, каждый штамм микроорганизмов продуцирует ЦГТазу со специфическими свойствами, которые могут быть похожими в рамках видовой специфичности микроорганизмов-продуцентов (Абеян В.А., 1992 и др.). Эта особенность микроорганизмов делает актуальным проведение постоянного скрининга и селекции новых продуцентов ЦГТаз со строго определенными свойствами.

Целью исследований являлось проведение скрининга продуцентов внеклеточных ЦГТаз из почвы Татарстана и получение микроорганизмов гиперпродуцентов этого фермента методами индуцированного мутагенеза.

На первом этапе скрининга суспензию из проб накопительной культуры рассеивали на чашки с картофельной средой и выращивали до формирования колоний. Колонии, вокруг которых имелись зоны просветления, пересеивали в жидкую среду, содержащую 2% крахмала.

На следующем этапе, в культуральной жидкости (КЖ) выделенных изолятов, определяли количество ЦД и активность ферментов. Для анализа большого количества проб КЖ, мы применяли чашечный метод определения активности β -ЦГТаз. В основе этого метода свойство β -циклодекстринов в щелочных условиях образовывать бесцветные комплексы с фенолфталеином. Фенофталеиновый метод позволяет определять ЦГТазную активность даже в присутствии амилазы и глюкоамилазы (Taguchi, 1986). По положительной реакции на ЦГТазу было отобрано 89 изолятов из 6 серий образцов почвы.

Известно, что микроорганизмы продуценты ЦГТаз одновременно синтезируют и другие ферменты амилолитического комплекса, которые также могут давать зоны

просветления при росте на среде содержащей крахмал. Учитывая это, нами было проведено определение декстринирующей активности изолятов. Декстринирующая активность в культуральной жидкости изолятов составила от 0,75 до 2,01 усл.ед.

Количественное определение β -ЦГТазной активности в КЖ по методу Кестнера (Кестнер А.И.,1989) показало, что уровень внеклеточной β -ЦГТазной активности природных изолятов находился в пределах 0,04-0,16 ед./мл., удельная активность соответственно 0,06-1,60*10⁻² ед./мг белка.

При изучении специфичности ЦГТаз (J.Szejtli, 1988) установлено, что большинство выделенных изолятов синтезировали как α -, так и β -ЦД, только изоляты С-7-1 и К-11 преимущественно образовывали β -ЦД.

У наиболее активных изолятов было проведено сравнительное изучение динамики накопления ЦД. Установлено, что в культуральной жидкости изолята С 7-1 большое количество β -ЦД достигается уже через 24 часа культивирования (11,97 мг/мл). Через 48 часов культивирования у всех изолятов образуется большое количество ЦД (19,8-30,3 мг/л). К 72 часам количественное содержание β -ЦД у штаммов А-1-7 и С-7-1 не изменяется, а максимальное количество наблюдается у штамма В-9 (30,34 мг/л).

Для определения таксономического положения наиболее активных изолятов провели изучение некоторых морфологических и цитологических свойств. По результатам изучения все изоляты являются, подвижными аэробными бактериями палочковидной формы. Размеры клеток в пределах 0,24х2,47 - 0,57х4,09; окраска по Граму - вариабельна, спорообразование наблюдали у изолятов А-1-7, В-9 и С-7-1, которых отнесли к роду *Bacillus*.

С целью выявления наиболее активных продуцентов ЦГТаз провели изучение влияния условий культивирования продуцентов на активность ЦГТазы. Изучали влияние углеводных, белковых, минеральных компонентов и рН среды, время культивирования и условия аэрации на синтез ЦГТазы. Обнаружено, что максимальное количество ЦГТазы образуется, когда в качестве источника углерода используется растворимый крахмал. Добавление в питательную среду различных концентраций моно и дисахаров- глюкозы, лактозы, сахарозы, маннозы, фруктозы не способствовало образованию значительного количества фермента. В качестве источника азота использовали концентрированный настой зерна кукурузы, пептон, дрожжевой автолизат, гидролизат лактоальбумина и лактопептон. Максимальный синтез ЦГТазы отмечался при росте культур в средах с кукурузным экстрактом в стационарной фазе роста культуры через 48 часов, а при интенсивной аэрации в лабораторном ферментере - через 16- 20 часов. При изучении влияния рН питательной среды на синтез ЦГТазы установлено, что ЦГТазы активнее всего синтезировалась при культивировании в средах с нейтральным и слабо щелочным значением рН. Добавление карбоната натрия в питательную среду повышало выход ЦД более чем в два раза.

С целью получения гиперпродуцента ЦГТаз, выделенный изолят, который обозначили как *Bacillus species* С-7-1, подвергли УФ-облучению. В результате индуцированного мутагенеза и последующего отбора получены 2 штамма, которые стабильно синтезируют активную ЦГТазу и при пассажах имеют меньшее количество ревертантов. Количество ЦД через 36-48 часов культивирования на 18-20 % больше, чем у исходного штамма (до 35-38 мг/л).