Описание физико - биохимических свойств нового фермента 15-й семьи гликозил-гидролаз гриба MYCELIOPHTHORA 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 pH и температурным оптимумами действия фермента равными 4,0-4,5 и 55-60oC соответственно, новая ГлА проявляла максимум активности по отношению к крахмалу при pH 5,5 и 70oC 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).