

СРАВНЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РАЗЛИЧНЫХ ЦИКЛОДЕКТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗ

© 2011 П.Ю. Федорова, Е.А. Гильванова, Н.Г. Усанов

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа

Поступила 01.07.2011

Приводятся данные, указывающие на факт высокой частоты встречаемости способности к образованию циклодекстринов среди бактерий рода *Paenibacillus* (Ash et al. 1994 emend. Behrendt et al. 2010). Проведено сравнение физико-химических и каталитических свойств циклодекстринглюканотрансфераз четырех штаммов, выделенных из почвы тремя различными методами и охарактеризованных филогенетически в качестве представителей *P.macerans*, *P.ehimensis*, *P.illinoisensis* и *P.campinasensis*.

Ключевые слова: циклодекстрины, ЦД, циклодекстринглюканотрансфераза, ЦГТаза, *Paenibacillus*, *P.macerans*, *P.ehimensis*, *P.illinoisensis*, *P.campinasensis*.

Циклодекстринглюканотрансфераза (ЦГТаза, КФ 2.4.1.19) – фермент, катализирующий реакции межмолекулярного трансгликозилирования, в своей сумме приводящие к деполимеризации крахмала и образованию циклодекстринов (ЦД) – нередуцирующих макроциклических олигосахаридов, широко используемых в пищевой промышленности, фармацевтике, косметике, органическом синтезе [1].

Наиболее распространены и известны, альфа-(α), бета-(β) и гамма-(γ) ЦД, молекулы которых состоят из 6, 7 и 8 остатков D-глюкопиранозы, связанных α -1 \rightarrow 4-D связями. При действии ЦГТаза на крахмал в реакционной смеси одновременно образуются и накапливаются все три гомолога, ингибирующие действие фермента.

В зависимости от того, какой продукт доминирует в продуктах конверсии, различают (α)-, (β)- и (γ)-ЦГТаза, природа которых в свою очередь зависит от генетическо-видовых особенностей штамма-продуцента.

Несмотря на обилие публикаций о выделении новых бактерий, способных к синтезу ЦГТаза, накопленный материал зачастую оторван от современных таксономических описаний, названия изолятов бактерий не соответствуют действительности, а сами публикации фактически лишены смысла. Филогенетически изучены лишь единичные штаммы аэробных спорообразующих бактерий, таких как *Paenibacillus macerans* [2], *P.illinoisensis* [10], *P.graminis* [19], *P.stellifer* [17], *P. campinasensis* [20], *Bacillus agaradhaerens* [14]. Единичные продуценты позиционированы на физиолого-биохимическом уровне на уровне родов *Klebsiella* [9].

Несмотря на перечисленные факты, даже в последних обзорах [16, 18], посвященных сравнительному описанию продуцентов ЦД, в качестве основной родовой группы продолжает фигурировать род *Bacillus*, Cohn 1872.

Практически не имеется работ, в которых бы в рамках одной лаборатории проводилось сравнение свойств нескольких ЦГТаза бактерий различных видовых групп, прошедших филогенетическую идентификацию. Целью настоящего исследования является восполнение пробелов в данной тематике.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали лиофильно высушенные препараты циклодекстринглюканотрансфераз продуцентов из коллекции лаборатории прикладной микробиологии Института биологии УНЦ РАН: *Paenibacillus ehimensis* ВКМВ-2680D (IB-739), *P.illinoisensis* IB-1087, *P.campinasensis* IB-417, *P.macerans* IB-14 (IB-1053).

Выращивание бактерий *Paenibacillus ehimensis* осуществляли в 250 мл качалочных колбах содержащих 50 мл среды, при скорости 180 об/мин при 37 \div 39 $^{\circ}$ C в течение 68 \div 72 ч, на среде, содержащей (в граммах): крахмал – 10,0; пептон – 4,0; дрожжевой экстракт – 5,0; КН₂Р₄ – 1,0; СаСО₃ – 1,0; дистиллированную воду до 1000 мл, при стартовых рН 7,0 \div 7,2.

Наработку ЦГТаза *P.illinoisensis* IB-1087 проводили в вышеописанных условиях на среде К1, содержащей (в граммах): крахмал – 10,0; пептон – 5,0; дрожжевой экстракт – 5,0; КН₂Р₄ – 2,0; Na₂НР₄ – 2,0; дистиллированную воду до 1000 мл, при стартовых рН 7,2 \div 7,4.

Наработку ЦГТаза *P.campinasensis* IB-417 проводили на среде К1 с добавлением 0,8 \div 1,0% Na₂СО₃, при стартовых рН 9,2 \div 9,8.

Наработку препарата ЦГТаза *P.macerans* IB-14 проводили на среде, содержащей (в граммах): крахмал – 10,0; пептон – 3,0; дрожжевой экстракт – 3,0; кукурузный экстракт – 3,0; (NH₄)₂SO₄ – 0,2; СаСО₃ – 1,0; дистиллированную воду до 1000 мл, при стартовых рН 7,4 \div 7,8.

ЦГТазную активность растворов и препаратов измеряли фенолфталеиновым методом [3], используя для разбавления фермента 50 мМ ацетатный буфер рН 6,0 \div 6,1, содержащий 10 мМ СаСl₂. За 1 единицу активности принимали количество ЦГТаза, катализирующее образование 1 мкМ β -ЦД в течение 1 мин при 40 $^{\circ}$ C.

Федорова Полина Юрьевна, e-mail: millinariya@yandex.ru;
Гильванова Елена Альбертовна, канд. биол. наук, e-mail: gelena@anrb.ru;
Усанов Николай Глебович, канд. биол. наук, e-mail: nikusa@anrb.ru.

Для выделения ЦГТазы из культуральной жидкости бактериальные клетки отделяли центрифугированием при 6000 мин^{-1} в течение 30 мин, фильтрат культуральной жидкости концентрировали методом ультрафильтрации на полых волокнах ВПУ-50. Для получения сухого не очищенного препарата концентрат подвергали лиофильной сушке в аппарате «ИНЕЙ-6».

Аналитическое определение специфичности ЦГТаз осуществляли следующим методом. Пробы (5 мл) реакционной смеси, состоящей из клейстеризованного картофельного крахмала в 50 мМ ацетатном буфере (рН 6,0), ЦГТазы и 10 мМ CaCl_2 , помещали в биологический термостат и выдерживали при 40°C в течение 24 часов. По истечении указанного интервала времени, из пробирок извлекали по 900 мкл образцов, которые помещали в 2,0 мл пробирки Эппендорф. В каждую из проб вносили по 90 мкл 10%-ного раствора ксилоты, игравшей роль внутреннего стандарта. После завершения указанных манипуляций в пробирки дозировали по 990 мкл ацетонитрила ОСЧ для хроматографии и отделяли образовавшийся осадок крахмала центрифугированием при 8000 мин^{-1} в течение 10 минут. Порции супернатанта, соответствующие условиям реакции, анализировали с помощью ВЭЖХ на колонке «SEPARON-NH₂»-5мкм (3x150 мм), используя в качестве элюента смесь ацетонитрил – вода в объемном соотношении 63:37. Подачу растворителя осуществляли насосом HPP-5001 со скоростью 0,7 мл/мин, а в качестве детектора использовали рефрактометр RIDK-102. Регистрацию и оцифровку аналогового сигнала, последующую обработку хроматограмм проводили с помощью программно-вычислительного комплекса «Мульти-хром 1.59». Калибровку прибора осуществляли методом внутреннего стандарта, используя индивидуальные ЦД производства «Wacker Chemie» (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения ферментных препаратов использованы культуры из коллекции лаборатории прикладной микробиологии Института биологии УНЦ РАН *Paenibacillus illinoisensis* (IB-1087), *P. ehimensis* ВКМ В-2680D (IB-739), *P. macerans* (IB-1053), *P. campinasensis* (IB-417). Три первых штамма были выделены из почвы с помощью аэробной и анаэробной накопительной среды на основе растворов 0,5% β -циклодекстрина [4, 5]. Алкалолентный штамм *P. campinasensis* IB-417 обнаружен в процессе скрининга продуцентов щелочных бактериальных целлюлаз на щелочной элективной среде, содержащей в своем составе 0,5% КМЦ-На и 1% Na_2CO_3 (рН=10,0÷11,0).

Способность к синтезу ЦД, была обнаружена лишь после выполнения 16S рРНК анализа и обнаружения близкого сходства прочитанной последовательности гена с таковыми, описанными ранее бразильскими авторами у культур *P. campinasensis*

JCM11200 (№ NCBI=AB073187) и *P. campinasensis* BL11 (DQ232773) [7-8; 20].

Для наработки образцов ферментов использовали среды и режимы культивирования, приведенные в материалах и методах.

Препараты подвергали частичной очистке пересаживанием, высаливанием, хроматографическими и абсорбционными методами.

Используя стандартные процедуры, исследовали физико-химические свойства выделенных белков, их молекулярную массу.

Результаты описаний ЦГТаз 4-х видов бактерий, выделенных в нашей лаборатории и охарактеризованных филогенетическими методами, сведены в таблице.

Суммируя полученные результаты, можно указать на тот факт, что описания ЦГТаз *P. macerans* IB-1053 и *P. campinasensis* IB-417, *P. illinoisensis* IB-1087 были близки к описанным ранее для культур тех же видов.

Весьма важной характеристикой ЦГТаз является их специфичность в отношении спектра ЦД, накапливающихся в продуктах конверсии крахмала [1]. По преобладающему продукту реакции дают название ЦГТазе, указывая что она, например, относится к β -типу. По доминантному продукту реакции принято разделять циклизующие ферменты на α -[11], β -[8] и γ -ЦГТазы [12; 13].

Вместе с тем, в расчет не берется тот факт, что само соотношение $[\alpha\text{-ЦД}]:[\beta\text{-ЦД}]:[\gamma\text{-ЦД}]$ в продуктах реакции динамично меняется во времени, и зачастую, весьма существенно. Например для α -ЦГТаз *P. macerans* описаны серьезные вариации соотношения $\alpha\text{-ЦД}:\beta\text{-ЦД}:\gamma\text{-ЦД}$, возникающие в течение реакции, равно как и при вариациях стартового соотношения субстрат/фермент (E/S).

Учитывая, что условия выбора режима реакции зависит, как от воли автора исследования, так и от использованных им методов измерения циклизующей активности, сравнение ЦГТаз, кинетические свойства которых были исследованы в разных лабораториях зачастую не возможно.

В этой связи для изучения кинетических особенностей ЦГТаз, имевшихся в нашем распоряжении, был применен собственный подход, основанный на определении безразмерных коэффициентов, являющихся отношениями молярных концентраций $KU_\alpha=[\beta\text{-ЦД}]/[\alpha\text{-ЦД}]$ и $KU_\gamma=[\beta\text{-ЦД}]/[\gamma\text{-ЦД}]$ в продуктах суточной конверсии крахмала.

Измерения велись в широком диапазоне стартового соотношения (E/S), а в качестве единицы характеризующей количество ЦГТазы, была использована ее активность в мкКат, измеренная фенолфталеиновым методом.

На рис. представлены результаты сравнения каталитических свойств четырех штаммов циклодекстриногенных бактерий относящихся к роду *Paenibacillus*.

Таблица. Сравнение свойств ЦГТаз четырех видов бактерий рода *Paenibacillus*

	Источник ЦГТазы	S*	ММ**	pH _{пт}	pH _{стаб.}	T _{опт.}	τ _{50%} ***	pI	16S pPHK NCBI
А	<i>P.illinoisensis</i> IB-1087	β-	68	7,0	5-9	55	19 мин	5.1	FN422001.1
Б	<i>P.macerans</i> IB-1053	α-	70	5,5	7-9,5	55	6,2 мин	4.9	AM406669.1
В	<i>P.ehimensis</i> IB-739	β-	75	6,0	5,5-8,2	40	5,3 мин	Н.д	FN582329.1
Г	<i>P.campinasensis</i> IB-417	β-	82	7,0	6-10	60	3 часа 15 мин	Н.д	FN429977.1

Прим.: S* – специфичность (дозировка 10 ед/г крахмала, 40°C, 1 ч); ММ** – молекулярная масса; τ_{50%}*** – время экспозиции образца ЦГТазы при 55°C, вызывающее 50% снижение его активности при pH 6,0 без субстрата

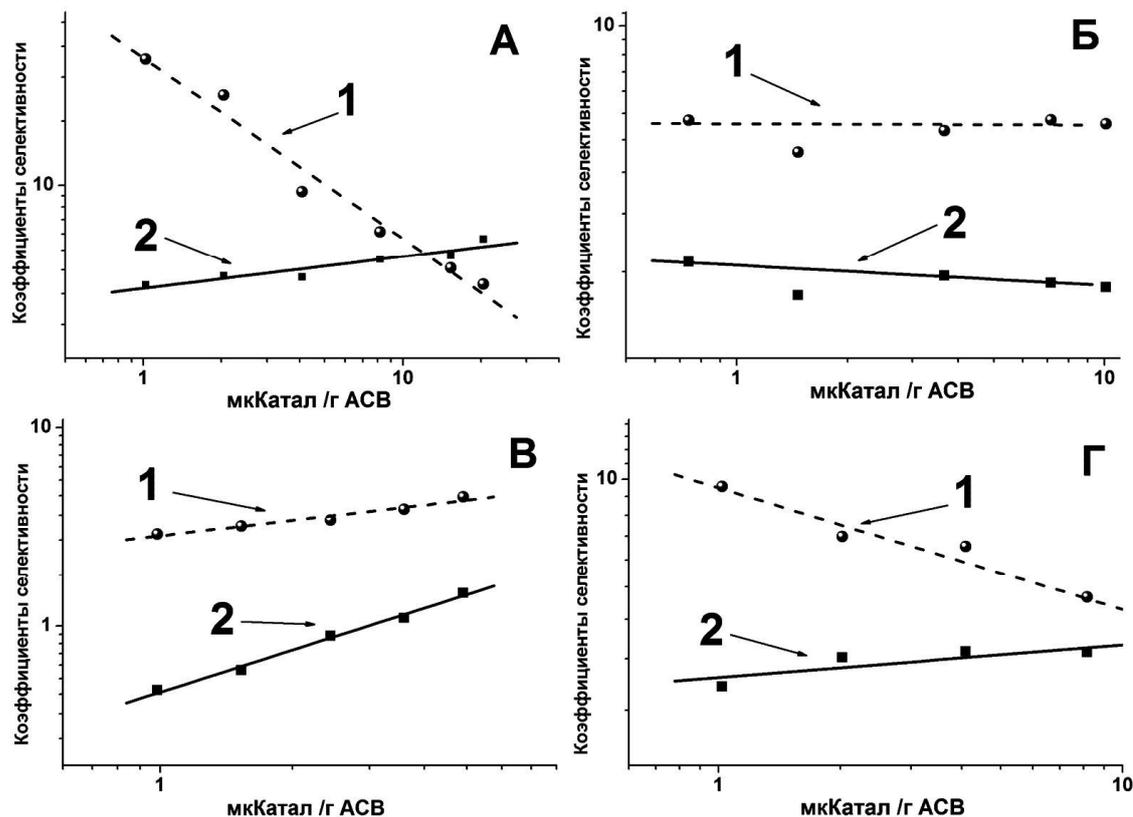


Рис. Зависимость выхода циклодекстринов от концентрации ЦГТаз, выделенных из бактерий различных видов в течение 24 ч трансформации 2,75% крахмала: А – *Paenibacillus campinasensis* IB-417; Б – *P.ehimensis* IB-739; В – *P.macerans* IB-14; Г – *P.illinoisensis* IB-1087. Кривые (1) и (2) обозначают величины безразмерных коэффициентов равных молярным отношениям $[\beta\text{-ЦД}]/[\alpha\text{-ЦД}]$ и $[\beta\text{-ЦД}]/[\gamma\text{-ЦД}]$ в продуктах реакции соответственно

Обнаружено, что во всех 4-х случаях зависимость молярных соотношений $KU_{\alpha} = [\beta\text{-ЦД}]/[\alpha\text{-ЦД}]$ и $KU_{\gamma} = [\beta\text{-ЦД}]/[\gamma\text{-ЦД}]$ от величины (E/S) в двойных логарифмических координатах вырождаются в линейные (рис. 1). Полученная информация позволяет подробно описывать и сравнивать динамику накопления различных форм ЦД, а также ее зависимость от дозы внесенного фермента для разных типов ЦГТаз. Например, при использовании β-ЦГТазы алкалотолерантной *P.campinasensis* (А), накопление β-ЦД относительно α-ЦД падает с увеличением относительной дозировки фермента и этот процесс сопровождается ростом отношения KU_{α} , из чего следует, что удельный выход γ-ЦД

также снижается по мере продолжения реакции. Схожими кинетическими особенностями обладает бета-ЦГТазы *P.illinoisensis* (Г). Оба фермента, на ранних стадиях реакции (что адекватно низким удельным дозировкам ЦГТаз) катализируют преимущественное образование длинноцепочечных β-ЦД и γ-ЦД, которые по мере накопления начинают изомеризоваться в α-ЦД (6 глюкозных остатков). ЦГТазы *P.macerans* (В) катализируют трансформацию крахмала иным образом: сначала в среде накапливается α-ЦД, который по мере увеличения (E/S) трансформируется в β-ЦД. Каталитическая «ретрансформация» α- и γ-ЦД в β- форму, по мере нарастания их концентраций в ходе реакции явля-

ется типичной и хорошо известной особенностью ферментов данного типа [15]. Бактерии вида *P.ehimensis* секретируют ЦГТазу широкой специфичности (Б), инициирующую превращение крахмала до смесей, пригодных для одновременного синтеза одновременно трех циклических декстринов. Для этого фермента характерно образование относительно постоянных соотношений α -, β - и γ -ЦД, мало зависящих от дозы внесенной ЦГТазы. ЦГТазы *P.campinasensis* в первые моменты реакции отличается ярко выраженной β -специфичностью, (А) но по мере трансформации субстрата в среде накапливается значительное количество α -формы. Оптимальными для трансформации крахмала в ЦД для всех четырех типов ЦГТаз можно считать их удельные дозировки на уровне $8 \div 10$ мкКат/1г субстрата.

Таким образом, 4 культуры бактерий, секретирующие ЦГТазу и выделенные 3-мя различными методами, с использованием бета-ЦД и КМЦ-На в качестве субстрата накопительных сред, принадлежат к роду *Paenibacillus*. ЦГТазы *P.illinoisensis* IB-1087; *P.macerans* IB-1053; *P.campinasensis* IB-417 по своим физико-химическим свойствам близки к описанным в литературе. Описание ЦГТазы *P.ehimensis* IB-739 (ВКМ В-2680D) выполнено впервые. Также впервые обнаружено, что при действии ЦГТаз на крахмал зависимость отношений $[\beta\text{-ЦД}]/[\alpha\text{-ЦД}]$ и $[\beta\text{-ЦД}]/[\gamma\text{-ЦД}]$ от величины (E/S) в двойных логарифмических координатах вырождаются в линейную.

Николай Глебович Усанов, один из авторов, скоропостижно скончался при подготовке статьи к публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абелян В.А. и др. Сравнительная характеристика циклодекстрингликозилтрансфераз различных групп микроорганизмов // Биохимия. 1992. Т. 57. № 3. С. 430-437.
2. Абелян В.А., Афан К.Б., Манукян Л.С. Новые циклодекстрингликозилтрансферазы, продуцируемые *Bacillus macerans* // Прикладная биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 4. С. 395-401.
3. Усанов Н.Г. и др. Усовершенствованный метод фотометрического определения активности циклодекстрингликозилтрансферазы // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 1. С. 118-124.
4. Усанов Н.Г., Логинов О.Н., Мелентьев А.И. Синтез циклодекстрингликозилтрансфераз микроорганизмами, утилизирующими циклодекстрины в качестве единственного источника углерода // Докл. АН СССР. 1989. Т. 310. № 6. С. 1489-1492.
5. А.с. 1703681 СССР. Способ выделения бактерий *Bacillus macerans* из почвы / Усанов Н.Г. и др. Опубл. 1991.
6. Abelyan V.H. Cyclodextrins: Production and uses. Kuala Lumpur, 2005. 511 p.
7. Alves-Prado H.F., Gomes E., Da Silva R. Evaluation of solid and submerged fermentations for the production of cyclodextrin glycosyltransferase by *Paenibacillus campinasensis* H69-3 and characterization of crude enzyme // Appl. Biochem. Biotechnol. 2006. V. 129. № 1. P. 234-246.
8. Alves-Prado H. F., Gomes E., Da Silva R. Purification and characterization of a cyclomalto-dextrin glucanotransferase from *Paenibacillus campinasensis* strain H69-3 // Appl. Biochem. Biotechnol. 2007. V. 137. P. 41-55.
9. Binder F., Huber O., Bock A. Cyclodextrin-glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M5a1: Cloning, nucleotide sequence and expression // Gene Lehrstuhl für Mikrobiologie. 1986. V. 47. № 3. P. 269-277.
10. Doukyu N., Kuwahara H., Aono R. Isolation of *Paenibacillus illinoisensis* that produces cyclodextrin glucanotransferase resistant to organic solvents // Biosci., Biotechnol. Biochem. 2003. V. 67. № 2. P. 334-340.
11. Gawande B., Patkar A. Alpha-cyclodextrin production using cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22 // Starch/Staerke. 2001. V. 53. № 2. P. 75-83.
12. Hirano K. et al. Molecular cloning and characterization of a novel gamma-CGTase from alkaliphilic *Bacillus* sp. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 70. № 2. P. 193-201.
13. Kato T., Horikoshi K. A new gamma-cyclodextrin forming enzyme produced by *Bacillus subtilis* No.313 // Starch Sci. 1986. V. 33. № 2. P. 137-143.
14. Martins R.F., Hatti-Kaul R. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: Purification and characterisation // Enzyme and Microbial Technology. 2002. V. 30. № 1. P. 116-124.
15. Patrick Lee K.C., Tao B.Y.A kinetic study of cyclodextrin glycosyltransferase: Substrate and product inhibitions // Biotechnol. Appl. Biochem. 1995. V. 21. № 1. P. 111-121.
16. Sivaramakrishnan S. u др. α -Amylases from microbial sources-An overview on recent developments // Food Technol. Biotechnol. 2006. V. 44. № 2. P. 173-184.
17. Suominen I. и др. *Paenibacillus stellifer* sp. nov., a cyclodextrin-producing species isolated from paperboard // Intern. J. System. Evolution. Microbiology. 2003. V. 53. № 5. P. 1369-1374.
18. Tonkova A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase // Enzyme and Microbial Technology. 1998. V. 22. № 8. P. 678-686.
19. Vollu R.E. et al. Cyclodextrin production and genetic characterization of cyclodextrin glucanotranferase of *Paenibacillus graminis* // Biotechnol. Lett. 2008. V. 30. № 5. P. 929-935.
20. Yoon J.H. et al. *Paenibacillus campinasensis* sp. nov., a cyclodextrin-producing bacterium isolated in Brazil // Intern. J. System. Bacteriology. 1998. V. 48. № 3. P. 833-837.

CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASES OF DIFFERENT *PAENIBACILLUS* SPECIES

© 2011 P.Y. Fedorova, E.A. Gilvanova, N.G. Usanov

Institute of Biology, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

The data presented point to the fact the high frequency of ability to form cyclodextrins among bacteria of the species *Paenibacillus*. Made comparison of physico-chemical and catalytic properties CGTases four strains isolated from soil by three different methods and characterized as representative of the phylogenetic *P.macerans*, *P.ehimensis*, *P.illinoisensis* and *P.campinasensis*.

Key words: cyclodextrins, CDs, Cyclodextrin glycosyltransferases, CGTases, *Paenibacillus*, *P.macerans*, *P.ehimensis*, *P.illinoisensis*, *P.campinasensis*.

Fedorova Polina Yurievna, e-mail: millinariya@yandex.ru; Gilvanova Elena Albertovna, Candidate of Biology, e-mail: gelena@anrb.ru; Usanov Nikolay Glebovich, Candidate of Biology, e-mail: nikusa@anrb.ru.