

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ СТАБИЛЬНОГО БИОСИНТЕЗА ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ *PAENIBACILLUS EHIMENSIS* IB-739

© П.Ю. Мильман, Е.А. Гильванова

Для устойчивого биосинтеза и увеличения активности циклодекстринглюканотрансферазы бактерий *Paenibacillus ehimensis* IB-739 проведен поиск подходящих компонентов питательной среды по составу. Обнаружено, что присутствие катионов кальция в питательной среде в концентрации $1 \div 2$ г/л ингибирует образование экстрацеллюлярных полисахаридов в процессе культивирования.

Ключевые слова: циклодекстринглюканотрансфераза, ЦГТаза, *Paenibacillus*, *Paenibacillus ehimensis*, культивирование, циклодекстрины, ЦД.

Циклодекстринглюканотрансфераза (ЦГТаза, КФ 2.4.1.19) – фермент, катализирующий реакции межмолекулярного трансгликозилирования, в конечном итоге приводящие к деполимеризации крахмала с образованием циклодекстринов (ЦД) – нередуцирующих макроциклических олигосахаридов, широко используемых в пищевой промышленности, фармацевтике, косметике, органическом синтезе [1]. Наиболее распространены и известны альфа-, бета- и гамма-ЦД, молекулы которых состоят из 6, 7 и 8 остатков D-глюкопиранозы, связанных альфа-1→4-D связями. Большинство ЦГТаз экстрацеллюлярны, и циклизующий фермент локализован с внешней стороны клеточной мембраны.

Известные продуценты ЦГТаз принадлежат к бактериям родов *Bacillus* и *Paenibacillus*, такие как *Paenibacillus macerans*, *P. illinoisensis*, *P. chibensis*, *P. graminis*, *P. stellifer*, *P. campinasensis*, *Bacillus agaradhaerens* [2–9]. Единичные продуценты позиционированы на уровне родов *Klebsiella* [10].

В определенных условиях бактерии рода *Paenibacillus* способны выделять в среду экстрацеллюлярные полисахариды (экзополисахариды, ЭПС), являющиеся энергетическим резервом клеток в условиях дефицита питательных веществ [11–13]. ЭПС – экзогенные продукты метаболизма микроорганизмов,

обладающие способностью образовывать гели различной плотности при малых концентрациях полисахарида. Исследуемый штамм *P. ehimensis* характеризуется способностью к образованию экзополисахаридов альгинатного типа, что в процессе культивирования приводит к формированию высоковязкой среды [13]. Хотя в процессе культивирования накопление экзополисахида не влияет существенно на уровень ферментативной активности ЦГТазы, тем не менее его присутствие создает серьезные трудности для выделения фермента из культуральной среды.

Целью настоящего исследования явилось конструирование состава питательной среды, обеспечивающей снижение вязкости экстрацеллюлярных полисахаридов в культуральной жидкости (КЖ), а также для устойчивого биосинтеза и увеличения активности ЦГТазы культурой *P. ehimensis* IB-739 как конечного продукта ферментации.

Материалы и методы. Объектом исследований служила культура аэробных спорообразующих бактерий *Paenibacillus ehimensis* ВКМВ-2680D из коллекции лаборатории прикладной микробиологии Института биологии УНЦ РАН, также известной под номерами IB-739 и ИБ-739 [14].

Фермент нарабатывали на среде К-1, состав которой приведен в таблице. Для выделения ЦГТазы из культуральной жидкости бактериальные клетки отделяли центрифугированием при 6000 g в течение 30 мин, фильтрат культуральной жидкости концентрировали методом ультрафильтрации на полых волокнах ВПУ-50 с пределом отсечения 50 кДа.

ЦГТазную активность ферментного препарата измеряли модифицированным фенолфталеиновым методом, используя для разбавления фермента 50 мМ ацетатный буфер pH 6,0÷6,1, содержащий 10 мМ CaCl₂ [15]. За 1 единицу активности принимали количество ЦГТазы, катализирующее образование 1 мкМ бета-ЦД в течение 1 мин при 40°C.

Прирост клеточной биомассы регистрировали фотометрическим методом, основанным на способности бактериальной суспензии поглощать либо рассеивать свет пропорционально количеству бактерий, по оптической плотности КЖ при длине волны 630 нм на спектрофотометре СФ-46 («ЛОМО», Россия).

Определение соотношения количества спор к количеству вегетативных клеток проводили путем прямого подсчета их в поле зрения при микроскопировании КЖ с исполь-

зованием фазово-контрастного устройства микроскопа «Leica DM 1000» (Германия).

Определение динамической вязкости КЖ осуществляли с помощью цифрового ротационного вискозиметра Brookfield LSRV (США) при скорости вращения ротора 10 об/мин.

Результаты и обсуждение. Конструирование питательной среды по составу выполняли, варьируя содержание субстрата, источников азота различной природы, буферных компонентов, источников кальция, в среде К-1. Выполняя пошаговое изменение концентрации указанных факторов в сторону увеличения или уменьшения, отмечали степень их влияния на результирующую активность ЦГТазы и вязкость КЖ. В соответствии с полученным откликом проводили дополнительные эксперименты, направленные на поиск оптимума концентрации исследуемого фактора при фиксированных значениях остальных. В таблице представлены результаты конструирования питательной среды для максимального биосинтеза ЦГТазы при одновременном измерении вязкости КЖ (приведены некоторые варианты состава питательных сред).

Из литературных данных известно, что на уровень продукции ЭПС имеют влияние

Т а б л и ц а

Подбор компонентов питательной среды для максимального биосинтеза ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739 и снижения накопления экзополисахарида (ЭПС)

Компонент, %	Содержание компонента в средах № ..., %									
	1 (К-1)	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Крахмал	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0	2,5
Пептон	0,4	–	0,4	0,4	0,4	0,3	0,45	–	0,3	0,3
Дрожжевой экстракт	0,5	–	0,5	0,5	0,5	0,3	0,45	–	0,3	0,3
Кукурузный экстракт	–	0,3	–	–	–	0,3	–	0,1	0,3	0,3
КН ₂ РО ₄	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	–	–	–	–	–
Na ₂ НРО ₄	0,1	–	0,1	0,1	–	–	–	–	–	–
(NH ₄) ₂ SO ₄	–	0,2	–	–	–	0,2	0,45	0,2	0,2	0,2
CaCl ₂	–	–	0,2	–	–	–	–	–	–	–
CaCO ₃	–	–	–	0,2	0,2	–	–	–	–	–
Характеристика КЖ, полученная на средах различного состава:										
Активность, ед/мл	2,53± ±0,2	1,85± ±0,2	2,54± ±0,5	2,86± ±0,5	3,75± ±0,5	2,31± ±0,4	1,13± ±0,2	0,65± ±0,4	1,24± ±0,4	0,75± ±0,2
Пределы вязкости КЖ, сПа	55– 75	970– 1065	970– 1065	1550– 1640	55– 75	1550– 1640	1550– 1640	55– 75	55– 75	55– 75

различные факторы, в том числе содержание фосфат-ионов и ионов Ca^{2+} [16]. Как следует из представленных данных, в условиях лабораторного эксперимента при работе с культурой *P. ehimensis* IB-739 использование двузамещенного фосфата натрия и карбоната кальция (вариант № 4, табл.) в составе питательной среды не приводит к снижению биосинтеза ЭПС. Возможно, это связано с тем, что одновременное наличие двух этих компонентов в составе среды, как показали данные контроля pH, приводит к сдвигу кислотно-основного равновесия и подщелачиванию среды, что негативно отражается на физиологическом состоянии штамма, вследствие чего активность ЦГТазы возрастает незначительно.

Максимальная активность при работе с культурой *P. ehimensis* IB-739 достигается на среде следующего состава (в граммах): крахмал – 10,0; пептон – 4,0; дрожжевой экстракт – 5,0; KH_2PO_4 – 1,0; CaCO_3 – 1,0; дистиллированная вода – до 1000 мл. При использовании питательной среды указанного состава был достигнут устойчивый биосинтез ЦГТазы культурой *P. ehimensis* IB-739, а также снижен уровень накопления экстрацеллюлярных полисахаридов. Таким образом, при выращивании штамма в присутствии карбоната кальция в концентрации 1÷2 г/л вязкость КЖ составила 55–75 сПа и была приемлема для выделения ЦГТазы и изучения ее свойств.

На среде оптимального состава была изучена динамика накопления ЦГТазы в процессе культивирования штамма *P. ehimensis* IB-739. Полученные данные представлены на рисунке.

Приведенные данные показывают, что начало роста вегетативных клеток отмечается через 13–15 ч после инокуляции. Секреция ЦГТазы начинается через 25–27 ч от начала культивирования с подъемом активности до максимального (и стабильного) уровня 3,7–4,2 ед/мл после 48–55 ч. Микроскопический анализ проб КЖ показал, что процесс активного деления клеток к этому времени прекращается. Спорообразование культуры *P. ehimensis* IB-739 в ферментационной среде начинается через 48 ч культивирования. Этот процесс полностью завершается через

72 ч, когда в среде накапливается максимальное количество ЦГТазы. При этом устойчивый биосинтез ЦГТазы наблюдается в период стационарной фазы роста и коррелирует с процессом перехода от вегетативной стадии роста к спорообразованию.

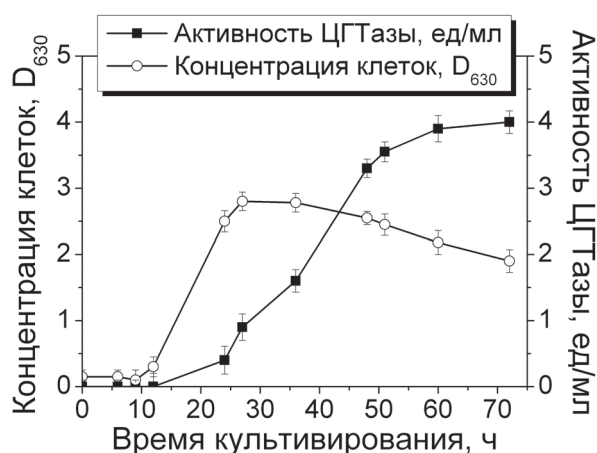


Рис. Динамика роста биомассы и синтеза ЦГТазы в ходе культивирования штамма *P. ehimensis* IB-739

Выводы. Резюмируя сказанное, следует отметить, что присутствие катионов кальция в питательной среде в концентрации 1÷2 г/л ингибирует образование экстрацеллюлярных полисахаридов, влияющих на вязкость КЖ, в процессе культивирования циклодекстриногенных бактерий *P. ehimensis* IB-739, вследствие чего достигается устойчивый синтез и увеличение активности фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abelyan V.H. Cyclodextrines: Production and uses. Kuala Lumpur, Malaysia: Stevian Biotechnology Corp. Snd. Bhd., 2005. 511 p.
2. Абелян В.А., Афян К.Б., Манукян Л.С. Новые циклодекстринглюканотрансферазы, продуцируемые *Bacillus macerans* // Прикладная биохимия и микробиология. 2000. Т. 36, № 4. С. 395–401.
3. Усанов Н.Г., Гильванова Е.А., Мелентьев А.И., Курченко В.П. Свойства циклодекстринглюканотрансферазы *Paenibacillus illinoisensis* IB-1087 // Труды Белорусского государственного университета (серия Биотехнология). 2008. Т. 3, № 2. С. 132–140.
4. Doukyu N., Kuwahara H., Aono R. Isolation of *Paenibacillus illinoisensis* that produces cyclodextrin

glucanotransferase resistant to organic solvents // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 2003. V. 67. P. 334–340.

5. Shida O., Takagi H., Kadowaki K., Nakamura L.K., Komagata K. Emended description of *Paenibacillus amylolyticus* and description of *Paenibacillus illinoisensis* sp. nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov // International Journal of Systematic Bacteriology. 1997. V. 47. P. 299–306.

6. Suominen I., Sproer C., Campfer P., Rainey F.A., Lounatmaa K., Salkinoja-Salonen M. *Paenibacillus stellifer* sp. nov., a cyclodextrin-producing species isolated from paperboard // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2003. V. 53. P. 1369–1374.

7. Alves-Prado H.F., Gomes E., Da Silva R. Purification and characterization of a cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus campinasensis* strain H69-3 // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2007. V. 13. P. 41–55.

8. Yoon J.H., Yim D.K., Lee J.S., Shin K.S., Sato H.H., Lee S.T., Park Y.K., Park Y.H. *Paenibacillus campinasensis* sp. nov., a cyclodextrin-producing bacterium isolated in Brazil // International Journal of Systematic Bacteriology. 1998. V. 48. P. 833–837.

9. 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. P. 116–124.

10. 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.

11. Козыровская Н.А., Негруцкая В.В., Ковальчук М.В., Вознюк Т.Н. *Paenibacillus* sp. – перспективная бактерия для создания технологии производства бакпрепаратов для растений // Biopolymers and cell. 2005. Т. 21, № 4. С. 312–318.

12. Егоренкова И.В., Трегубова К.В., Матара Л.Ю., Бурьгин Г.Л., Игнатов В.В. Состав и иммунохимическая характеристика экзополисахаридов ризобактерий *Paenibacillus polymyxa* 1465 // Микробиология. 2008. Т. 77, № 5. С. 623–629.

13. Логинов Я.О., Худайгулов Г.Г., Четвериков С.П., Мелентьев А.И., Логинов О.Н. Биополимер альгинатной природы с преобладанием L-гулурановой кислоты // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47, №3. С. 343–347.

14. Федорова П.Ю., Гильванова Е.А., Актуганов Г.Э., Усанов Н.Г. Очистка и свойства циклодекстринглюканотрансферазы бактерий *Paenibacillus ehimensis* ВКМ В-2680D // Биотехнология. 2012. № 4. С. 31–38.

15. Усанов Н.Г., Гильванова Е.А., Елизарьев П.А., Пруцакова Е.А., Мелентьев А.И. Усовершенствованный метод фотометрического определения активности циклодекстринглюканотрансферазы // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43, № 1. С. 118–124.

16. Отман С.А.М., Пшеничникова А.Б., Швец В.И. Экзопполисахарид облигатной метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei*: получение, очистка и изучение углеводного и фракционного состава // Вестник МИТХТ. 2011. Т. 6, № 6. С. 84–87.

CONSTRUCTION OF A NUTRIENT MEDIUM FOR SUSTAINABLE BIOSYNTHESIS OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE FROM *PAENIBACILLUS EHIMENSIS* IB-739

© P.Yu. Milman, E.A. Gilvanova

In order to achieve sustainable biosynthesis and get an increase in the activity of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from bacteria *Paenibacillus ehimensis* IB-739 we have performed a search for suitable nutrient medium components. It has been found that the presence of calcium ions in the growth medium at a concentration of 1÷2 g/l inhibits extracellular polysaccharides during cultivation and stabilizes the activity at a higher level.

Key words: cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase, *Paenibacillus*, *P. ehimensis*, cultivation, cyclodextrins, CDs.