

УДК 577.15:579.6

ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗА АЛКАЛОФИЛЬНОГО ШТАММА *Caldalkalibacillus mannanilyticus* IB-OR17-B1

© 2023 г. П. Ю. Мильман¹, Е. А. Гильванова¹, Г. Э. Актуганов¹, *

¹ Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: gleakt@anrb.ru

Поступила в редакцию 30.03.2023 г.

После доработки 15.04.2023 г.

Принята к публикации 29.04.2023 г.

Впервые охарактеризована внеклеточная циклодекстрин-глюканотрансфераза (ЦГТаза, К.Ф.2.1.19) штамма бактерий *Caldalkalibacillus mannanilyticus* IB-OR17-B1. Фермент выделяли из культуральной среды с помощью ультрафильтрации и аффинной адсорбции на кукурузном крахмале. Удельная активность ЦГТазы после очистки возрастала 18-кратно, выход составил 56%. Молекулярная масса очищенного фермента по данным денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле — 70 кДа. ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 проявляла максимальную циклизующую активность при pH 8.0 и температуре 60°C, была стабильна в диапазоне pH 7–10 и при температуре ≤70°C. Термостабильность фермента при 70°C повышалась на 10–15% в присутствии 5–10 мМ солей кальция и магния. Катионы Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ и Fe³⁺ в концентрации 5 мМ ингибировали ЦГТазу на 90, 26, 23, 18 и 11%, соответственно. Очищенная ЦГТаза при оптимальных условиях и концентрации фермента 1.0 ед./г субстрата в течение 24 ч осуществляла конверсию картофельного крахмала с образованием смеси альфа-, бета- и гамма- циклодекстринов в соотношении 38.8 : 52.6 : 8.6 (по массе) и выходом 42%.

Ключевые слова: циклодекстринглюканотрансфераза, циклодекстрины, *Caldalkalibacillus mannanilyticus*, алкалофильные бактерии, термостабильный фермент

DOI: 10.31857/S0555109923050124, **EDN:** UAFGUR

Циклодекстринглюканотрансфераза (ЦГТаза, К.Ф. 2.4.1.19) — внеклеточный фермент, катализирующий четыре взаимосвязанные реакции: циклизацию, связывание, диспропорционирование и гидролиз. Благодаря циклизующей активности, ЦГТаза является уникальным ферментом, способным превращать крахмал и родственные субстраты в циклодекстрины (ЦД) [1–3]. ЦД — циклические невосстанавливающие олигосахариды, состоящие из шести, семи или восьми единиц глюкозы, связанных альфа-(1-4)-гликозидными связями, и называемых, соответственно, альфа-(α-), бета-(β-) и гамма-(γ-)-ЦД [3]. ЦД обладают внутренней гидрофобной полостью и гидрофильной поверхностью, и могут образовывать комплексы включения с гостевыми молекулами, изменяя их физические и химические свойства [4, 5]. Благодаря этой особенности, ЦД находят широкое применение в пищевой, текстильной и косметической промышленности, сельском хозяйстве, фармацевтике, защите окружающей среды, а также в таких областях как надмолекулярная и аналитическая химия, мембранные технологии и др. [6–11].

Наряду с циклизующей активностью, большую практическую ценность имеют также гидролитические свойства ЦГТаз и их способность катализировать реакцию межмолекулярного трансгликозирования, что находит широкое применение при создании различных подсластителей-заменителей сахара, гомо- и гетероолигосахаридов, а также в целях улучшения качества лекарственных препаратов [12–14].

В недавнем исследовании ЦГТаза из *Bacillus cereus* YUPP-10 была использована в качестве фунгицидного агента, ингибирующего рост мицелия, прорастание и продукцию спор у *Verticillium dahliae* [15].

ЦГТаза обнаружена, главным образом, у бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus*, но встречается также и у представителей *Actinomyces*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacter* и др. [16–19].

Большинство бактериальных ЦГТаз катализуют реакцию трансформации крахмала с образованием смеси α-, β- и γ-ЦД. Выход и соотношение ЦД различаются в зависимости от происхож-

дения ЦГТаз и условий ферментативной реакции [16]. ЦГТазы из разных микробных источников различаются по кинетике образования той или иной формы ЦД, степени трансформации крахмала и наличию побочных реакций, снижающих уровень конверсии. По этой причине характеристика каждого нового типа ЦГТазы представляет не только теоретический интерес, но и привлекает большое внимание с точки зрения промышленного производства ЦД, особенно это касается алкалофильных микроорганизмов, обладающих высокой ферментативной активностью в широком диапазоне рН и температуры.

Цель настоящего исследования — очистка и характеристика ЦГТазы, продуцируемой алкалофильной бактерией *Caldalkalibacillus mannanilyticus* IB-OR17-B1, выделенной из донных отложений содового озера Белое (Бурятия, Россия).

МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования был выбран штамм *Caldalkalibacillus mannanilyticus* IB-OR17-B1 из коллекции Уфимского института биологии УФИЦ РАН. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) под номером В-2715D. Идентификация таксономического положения штамма была осуществлена ранее на основе изучения его физиолого-биохимических свойств и анализа гена 16S рПНК [20]. Последовательность 16S рДНК *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 депонирована в Генбанке NCBI под номером HE663240. После недавней таксономической ревизии семейства *Bacillaceae* [21], возникла необходимость в дополнительном уточнении филогенетического положения исследуемого штамма. Сравнительный анализ и поиск гомологичных последовательностей гена 16S рПНК проводили с помощью ресурсов EzBioCloud [22] и GenBank, а также онлайн-программ BLAST и MOLEBLAST [23]. Расчет эволюционных расстояний осуществляли по принципу максимального правдоподобия, филогенетическое дерево строили методом присоединения соседей, используя программу Mega X 10.0.4 [24]. Устойчивость топологии дендрограммы оценивали с помощью бутстреп-анализа из 500 заданных повторностей [25].

Культуру поддерживали на плотной питательной среде К1 следующего состава (мас. %): крахмал картофельный — 1.0; пептон — 0.4; дрожжевой экстракт — 0.5; KH_2PO_4 — 0.1; Na_2HPO_4 — 0.1; агар — 1.5, рН среды доводили до 7.9–8.0 добавлением 10%-ного стерильного раствора Na_2CO_3 . Для наработки препарата ЦГТазы штамм выращивали в жидкой среде того же состава без добавления агара (см. выше). Культивирование проводили в течение 96 ч в колбах Эрленмейера на 250 мл в шей-

кере-инкубаторе Innova 40R (“New Brunswick Scientific”, США) при 250 об./мин и 50°C.

Бактериальный рост оценивали по оптической плотности (ОП_{600}) культуральной жидкости (КЖ), измеренной на спектрофотометре СФ-56 (“ЛОМО-Спектр”, Россия) каждые 24 ч на протяжении 2–7 сут. Повторность измерений пятикратная.

Для выделения ЦГТазы из КЖ *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 бактериальные клетки удаляли центрифугированием на центрифуге ОПН-8 (“Дастан”, Киргизия) при 6000 об./мин в течение 30 мин. Полученный супернатант концентрировали с помощью ультрафильтрации на модуле VivaFlow 200 (“Sartorius”, Германия) с диаметром пор 30 кДа. Очистку ЦГТазы проводили методом крахмальной адсорбции по Мартинсу [26] с модификациями. К 20 мл концентрированного ферментного препарата добавляли нерастворимый кукурузный крахмал (5% вес/об.) и сульфат аммония до концентрации 1.0 М. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при пониженной температуре (8°C) и постоянном умеренном перемешивании для обеспечения максимально полной адсорбции фермента. Затем крахмал отделяли центрифугированием при 5000 g в течение 10 мин и дважды промывали равным объемом холодной воды. Адсорбированный фермент элюировали, инкубируя субстрат в течение 30 мин в присутствии 5 мл 1.0 мМ β -ЦД в 50 мМ трис-НСI буфере (рН 8.0) при 37°C и постоянном встряхивании, после чего смесь снова центрифугировали, как описано выше. Процедуру повторяли еще один раз с использованием 2 мл буфера для элюирования. Полученные элюаты объединяли (7 мл) и диализовали против 50 мМ трис-НСI буфера (рН 8.0) при 8°C.

Измерение активности ЦГТазы проводили фенолфталеиновым методом на спектрофотометре СФ-56 (“ЛОМО-Спектр”, Россия) при длине волны 553 нм [27]. Повторность измерений пятикратная. За 1 ед. активности ЦГТазы принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль β -ЦД из 2%-ного раствора растворимого картофельного крахмала (рН 6.9) в течение 1 мин при 50°C.

Наличие циклизующей активности у исследуемого фермента оценивали модифицированным методом Тильдена-Хадсона [28]. Формирование кристаллов комплекса α - и β -ЦД в присутствии йода определяли после 30-минутной инкубации при 37°C 3%-ного растворимого картофельного крахмала и раствора ферментного препарата в 50 мМ натрий-ацетатном буфере (рН 6.9). Визуально образование кристаллов оценивали в световом микроскопе “Leica DL1000” (“Leica Microsystems”, Германия) при увеличении $\times 100$. Изоб-

ражения получали с помощью цифровой камеры “Leica DFC290” того же производителя.

Молекулярную массу и степень чистоты фермента оценивали методом денатурирующего электрофореза в 12%-ном ПААГ по Лэммли. Белки в геле окрашивали Кумасси ярко-синим G-250 (“Fluka”, Швейцария) по методике [29]. В качестве маркеров молекулярной массы использовали набор неокрашенных рекомбинантных белков “PageRuler Broad Range” 5–250 кДа (“Thermo Scientific”, США). Концентрацию белка в растворах определяли спектрофотометрически по методу Варбурга и Кристиана [30].

pH-Оптимум очищенной ЦГТазы (5.5 ед./мл) определяли в интервале pH 3–10, используя в качестве растворителя 50 мМ фосфатно-цитратный (pH 4–7), натрий-фосфатный (pH 7–8), трис-HCl (pH 8–9) и глицин-NaOH (pH 9–11) буферные растворы. Стабильность фермента при разных pH оценивали, инкубируя его в тех же буферных растворах (pH 3–10, разведение 1 : 10 об./об.) в течение 1 ч при 28°C, после чего измеряли остаточную активность при pH 8.0. Активность образца, не подвергавшегося инкубации, принимали равной 100%.

Для определения температурного оптимума ЦГТазы реакционную смесь инкубировали в течение 60 мин при pH 8.0 и температурах от 40 до 90°C с дальнейшей оценкой скорости накопления ЦД по стандартной методике. Термостабильность фермента оценивали по уровню его остаточной активности (%) после 60 мин инкубации в диапазоне 40–90°C в отсутствии субстрата. Перед термообработкой очищенную ЦГТазу (5.5 ед./мл) разбавляли в 10 раз 0.1 М натрий-фосфатным буфером, pH 8.0.

Влияние катионов металлов на активность ЦГТазы оценивали, выдерживая очищенный фермент в присутствии 5, 10 и 15 мМ разных солей Ag^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , Pb^{2+} и Zn^{2+} (рис. 7). Все использованные в работе соли были марки “х. ч.”. Раствор фермента (5.5 ед./мл) разбавляли в 10 раз 0.1 М натрий-фосфатным буфером (pH 8.0), содержащим соли металлов в указанных концентрациях, и инкубировали смесь при 28°C в течение 1 ч, после чего определяли остаточную ферментативную активность стандартным методом. Аналогичным образом оценивали влияние ионов кальция и магния на термостабильность ЦГТазы при 70–80°C.

Анализ продуктов трансформации крахмала очищенной ЦГТазой осуществляли с помощью ВЭЖХ на жидкостном хроматографе “Laboratori Pistoje Praha” (Чехия). Реакционную смесь (5 мл) с ферментом в различных концентрациях (0.2–15 ед./г субстрата) и картофельный крахмал (3 мас. %), клейстеризованный в 50 мМ натрий-

фосфатном буфере (pH 8.0), инкубировали в течение 24 ч при 60°C. После инкубации из реакционной смеси отбирали пробы по 900 мкл в микроцентрифужные пробирки. К каждой из проб в качестве внутреннего стандарта добавляли 90 мкл 10%-ного раствора ксилозы, затем вносили 990 мкл ацетонитрила и удаляли остатки нетрансформированного крахмала центрифугированием при 8000 об./мин в течение 10 мин на центрифуге CM-50 (“ELMI”, Латвия). Супернатант разделяли на колонке “SEPARON-NH₂”-5 мкм (3 × 150 мм, “Tessek Ltd.”, Чехия), используя в качестве элюента смесь ацетонитрил–вода в объемном соотношении 63 : 37. Поддачу растворителя осуществляли насосом HPP-5001 со скоростью 0.7 мл/мин, в качестве детектора использовали рефрактометр RIDK-102 (“Laboratori Pistoje Praha”, Чехия). Регистрацию и оцифровку аналогового сигнала с последующей обработкой хроматограмм проводили с помощью программно-вычислительного комплекса “Мультихром” 1.59 (“Амперсенд”, Россия). Калибровку прибора осуществляли методом внутреннего стандарта, используя индивидуальные ЦД фирмы “Wacker Chemie” (США).

Эксперименты проводили в трехкратной повторности, статистическую обработку результатов осуществляли, используя программу Origin 7.0 (Origin Lab Corp., США). Достоверность отличий опытных вариантов от контрольных оценивали с помощью критерия Стьюдента. Результаты считали достоверными при критерии вероятности $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Культура алкалофильных аэробных спорообразующих бактерий *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1, известная ранее как *Bacillus mannanilyticus* IB-OR17-B1, была выделена в 2009 г. из донных отложений содового озера Белое (Россия). Вид *Bacillus mannanilyticus* изначально был назван в 2005 г. японскими исследователями при таксономической ревизии ранее выделенных штаммов алкалофильных бактерий [31]. Изменение текущего родового названия этого вида обусловлено недавним пересмотром классификации рода *Bacillus* на основе новых данных сравнительного филогенетического анализа более 300 геномов *Bacillus/Bacillaceae* [21]. Полученные результаты позволили выделить из рода *Bacillus* 17 отдельных монофилетических групп, составляющих, соответственно, новые рода семейства *Bacillaceae*. Род *Caldalkalibacillus* включает в настоящее время, помимо *C. mannanilyticus* еще три вида бактерий, проявляющих алкалофильные/алкалотолерантные и термофильные свойства [32, 33].

В связи с этим, текущее филогенетическое положение *B. mannanilyticus* IB-OR17-B1 было уточнено на основе сравнительного анализа последова-

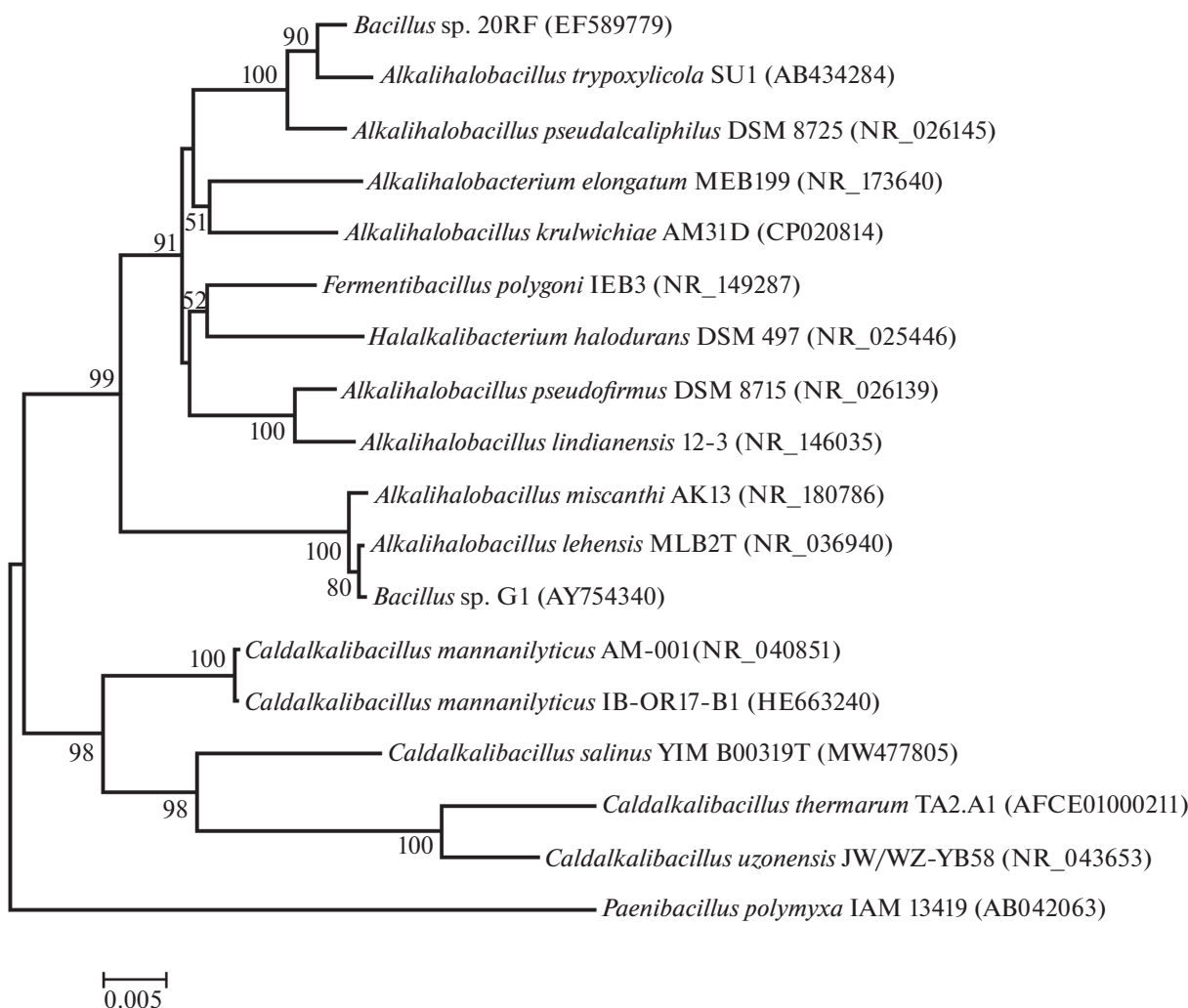


Рис. 1. Филогенетическое положение штамма *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 по гену 16S рРНК (1523 п. о.) по отношению к ближайшим родам алкалофильных бактерий семейства *Bacillaceae*. Филогенетическое дерево построено методом присоединения соседей, в узлах приведены значения бутстреп-поддержки (>50%). В качестве внешней группы выбран представитель *Paenibacillus polymyxa* IAM 13419. Масштаб отражает эволюционное расстояние, соответствующее 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов.

тельности гена 16S рРНК данного штамма и ранее охарактеризованных 4 видов *Caldalkalibacillus*, а также представителей близкородственных родов алкалофильных бактерий *Alkalihalobacillus* (7 видов), *Fermentibacillus*, *Halalkalibacterium* и *Alkalihalobacterium*. В эту группу включены также ближайшие по уровню сходства гена 16S рРНК последовательности алкалофильных продуцентов ЦГТаз. На филогенетическом дереве *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 образует общую кладу с референтными штаммами рода *Caldalkalibacillus* при высоком значении бутстреп-поддержки и показывает степень сходства 99.93% по отношению к типовому штамму вида *Caldalkalibacillus mannanilyticus* (рис. 1). Оценка филогенетического положения *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 внутри семейства *Bacillaceae* по последовательности гена

16S рРНК показала более высокую степень сходства данного штамма с представителями родов алкалофильных и галофильных бактерий, в отличие от аэробных и анаэробных термофилов, в том числе, продуцентов ЦГТаз, таких как *Anaerobranca*, *Caldanaerobacter* и *Thermoanaerobacterium* (последовательности не представлены на рис. 1). Топология филогении *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 совпадала с результатами филогенетической реконструкции, проведенной ранее для *Caldalkalibacillus* [34].

Штамм *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 продуцировал внеклеточную β -маннаназу и хитиназу, а также обладал антагонистической активностью в отношении некоторых фитопатогенных грибов [20]. Однако до настоящего времени не сообща-

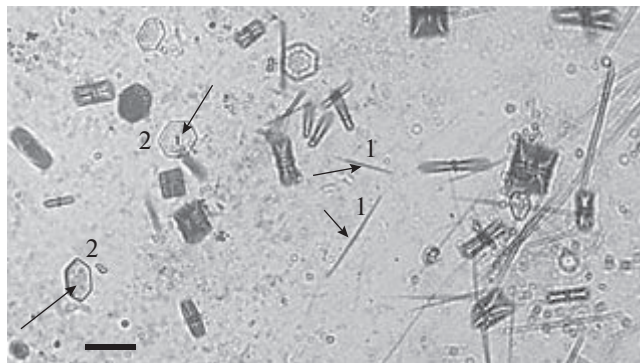


Рис. 2. Микрофотография кристаллов ЦД, образующихся при ферментативной трансформации 3%-ного растворимого картофельного крахмала (3 ч, 37°C) ЦГТазой *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1, согласно тесту Тильдена-Хадсона. Стрелки и цифры показывают кристаллы α - (1) и β -ЦД (2) в виде игл и призм, соответственно. Световая микроскопия, цена деления = 100 мкм.

лось о способности бактерий этого вида к синтезу ЦГТаз и продукции ЦД.

Штамм *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 активно рос на агаризованной среде К1 при 45–50°C, формируя зоны просветления крахмала вокруг колоний, соответствующие области образования и накопления ЦД, что подтверждалось фенолфталеиновым методом (данные не представлены). Циклизующая активность исследуемого фермента в КЖ качественно подтверждалась положительной реакцией Тильдена–Хадсона на формирование кристаллов комплекса йод–ЦД. При микрокопировании продуктов ферментативной трансформации крахмала отмечалось образование небольших и коротких призм β -ЦД, окрашенных в светло-коричневый цвет и резко отличающихся от иглообразных друз, характерных для комплекса α -ЦД и йода (рис. 2).

При культивировании в жидкой среде штамм показывал оптимум роста и синтеза ЦГТазы при 50°C. Накопление бактериальной биомассы достигало максимума на 48 ч, тогда как наибольший уровень секреции ЦГТазы достигался к 48–72 ч (рис. 3). Снижение ферментативной активности штамма к 96 ч культивирования, вероятно, связано не только с истощением исходного субстрата в среде, но и с накоплением в качестве побочных продуктов метаболизма глюкозы и мальтозы, оказывающих репрессирующее действие на синтез ЦГТазы [35].

Основную изоформу фермента выделяли из фильтрата культуральной среды с помощью ультрафильтрации и последующей аффинной сорбции на крахмале. В ранее опубликованных работах очистка ЦГТаз осуществлялась, как правило, по более сложной схеме, включающей этапы ультрафильтрации, гель-фильтрации, адсорбции на крахмале и ионообменной хроматографии [36–

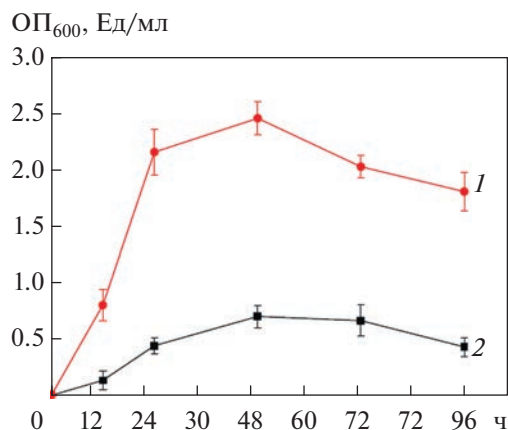


Рис. 3. Динамика роста (1) и продукции внеклеточной ЦГТазы (2) штаммом *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 при глубинном культивировании (250 об./мин, 50°C) в жидкой среде с 1%-ным картофельным крахмалом.

39]. Для ЦГТазы из *B. pseudocaliphilus* 20RF была применена комбинация ультрафильтрации и адсорбции на нерастворимом кукурузном крахмале (10 мас. %), что обеспечило мягкую и быструю процедуру очистки фермента с 18-кратным увеличением удельной активности и выходом 63% [40]. Данная схема была успешно воспроизведена для выделения ЦГТазы *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1. Наиболее высокая степень очистки фермента отмечалась на этапе аффинной сорбции на крахмале (табл. 1). Предварительная оптимизация параметров сорбции ЦГТазы в зависимости от типа крахмала и его концентрации показала, что нерастворимый кукурузный крахмал (5 мас. %) является более эффективным сорбентом по сравнению с нерастворимым картофельным крахмалом, благодаря чему не требуется проведение дополнительных стадий очистки фермента (данные не представлены).

Итоговая степень очистки фермента составляла около 18× при выходе 56%, при этом фермент демонстрировал электрофоретическую гомогенность, достаточную для характеристики его физико-химических и каталитических свойств. Молекулярная масса очищенной ЦГТазы, согласно результатам денатурирующего электрофореза, составляла около 70 кДа (рис. 4).

Близкие по молекулярной массе ЦГТазы были описаны ранее у штаммов алкалофильных бактерий *Bacillus* sp. 7–12 [41], *B. pseudocaliphilus* 20RF [40] и *B. pseudocaliphilus* 8SB [42].

Очищенный фермент проявлял наибольшую циклизующую активность при pH 8.0 (рис. 5a). pH-оптимум ранее охарактеризованных ЦГТаз варьировал в интервале pH 5–10, в зависимости от штамма-продуцента [40]. ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 сохраняла 92–100% своей пер-

Таблица 1. Очистка ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1

Стадия очистки	Объем, мл	ЦГТаза		Белок, мг	Степень очистки	Выход, %
		Ед.	Ед./мг белка			
Исходная КЖ	200	180	0.86	208	1.0	100
Ультрафильтрация	42	115.08	3.30	34.86	3.8	64
Адсорбция на крахмале	37	100.64	15.11	6.66	17.5	56

воначальной активности в интервале pH 7–10. Очищенный фермент был более стабилен при щелочных значениях pH, теряя около 50% первоначальной активности при pH > 10, тогда как при pH < 7.0 полуинактивация фермента наблюдалась уже при pH ~ 5.5–5.6 (рис. 6а). Максимальная скорость конверсии крахмала ЦГТазой *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 отмечалась при 60°C, тогда как при 90°C фермент полностью терял свою активность (рис. 5б).

Важной особенностью ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 была ее высокая термостабильность. Так, очищенный фермент сохранял более 60% первоначальной активности после 1 ч инкубации при 70°C (рис. 6б); период полуинактивации фермента составлял 1 ч при 75°C (данные не показаны). У штамма *B. pseudocaliphilus* 20RF

остаточная активность при 70°C составляла 31% после 30-минутной термообработки [40]. Охарактеризованные ранее ЦГТаза других видов алкалофильных бактерий отличались еще меньшей термостабильностью, сохраняя первоначальную активность при температурах не более 45–55°C [40]. Термостабильность ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 при 70°C незначительно повышалась в присутствии 5–10 мМ хлорида кальция. Остаточная активность фермента после 1 ч инкубации возрастала примерно на 10% по сравнению с контролем (рис. 6б). Многие исследования показывают, что, подобно амилазам, ЦГТаза имеют консервативные сайты связывания ионов Ca^{2+} , которые оказывают стабилизирующее действие на третичную структуру фермента, улучшая его термостабильность [38]. Добавление сульфата магния в тех же концентрациях оказывало менее выраженный положительный эффект: остаточная активность фермента после 30 мин термообработки увеличивалась не более чем на 5% (рис. 6б). Увеличение концентрации солей кальция и магния до 15 мМ не оказывало существенного влияния на стабильность фермента при 70°C (данные не представлены). Термостабильность ЦГТаза штамма *B. pseudocaliphilus* 20RF кратно возрастала в присутствии катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , а ее остаточная активность после 1 ч инкубации при 60°C составляла 72 и 46%, соответственно [40].

Таким образом, по сравнению с ЦГТазами, синтезируемыми штаммами других алкалофильных бактерий, ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 отличалась высокой активностью и стабильностью при pH 7–10 и температурах 60–70°C, что является существенным фактором в выборе фермента для производства ЦД.

Влияние ионов металлов на ЦГТаза различного происхождения может носить как ингибирующий, так и активирующий характер. Катионы металлов зачастую необходимы для поддержания активной конформации многих ферментов [38]. Нами была проведена оценка влияния солей разных групп металлов в концентрации 5 мМ на активность очищенной ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 (рис. 7). Наиболее выраженный ингибирующий эффект на ЦГТазу оказывали ионы серебра (снижение активности более, чем на

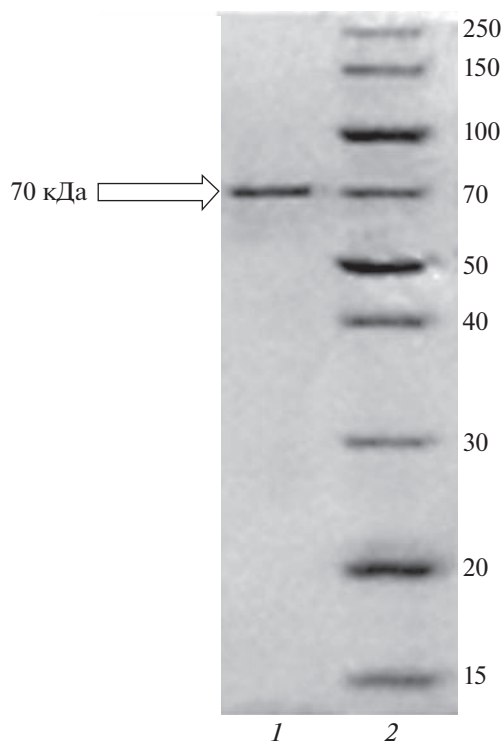


Рис. 4. Электрофореграмма препарата очищенной ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 в 12.5%-ном ПААГ с 0.1% ДДС-Na (1); белковые маркеры М.М. (кДа) (2).

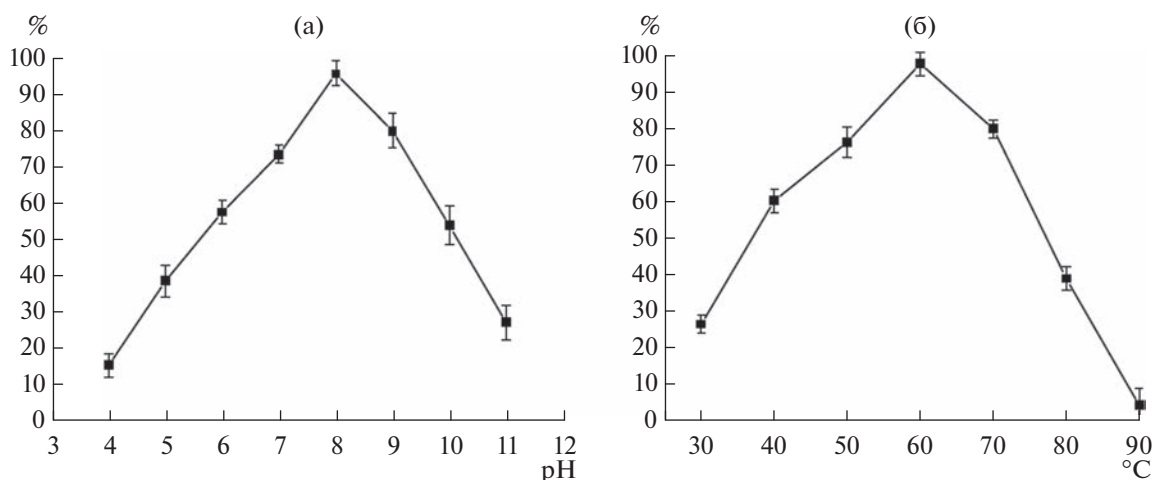


Рис. 5. Влияние pH (а) и температуры (б) на активность очищенной ЦГТаза (%) *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1. (Активность фермента в % от максимального значения).

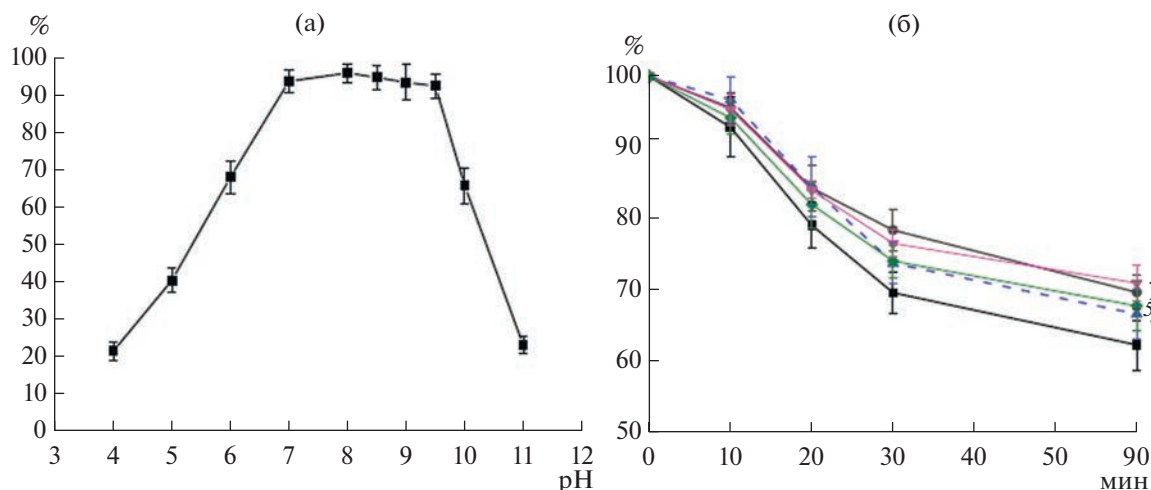


Рис. 6. Влияние pH при 28°C (а) и солей кальция и магния при 70°C (б) на стабильность очищенной ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1: 1 – контроль (фермент, инкубированный при 70°C без солей); 2, 3 – 5 и 10 mM CaCl₂; 4, 5 – 5 и 10 mM MgSO₄. На оси абсцисс – остаточная активность в % от первоначальной активности фермента, не подвергавшегося 1-часовой инкубации в интервале pH 4–11 (а) или 10–60-минутной термообработке при 70°C (б).

90%), далее в порядке убывания степени ингибирования следуют катионы меди, цинка, двух- и трехвалентного железа (снижение активности на 26, 23, 18 и 11% соответственно). Основной механизм ингибирования ЦГТаза катионами металлов может быть связан с окислением аминокислотных остатков фермента, участвующих в реакции циклизации [26]. Ранее сообщалось, что ионы меди оказывают значительное ингибирующее действие на ЦГТазы, продуцируемые штаммами *Bacillus* AL-6 [43], *B. firmus* [44, 45] и *B. agaradhaerens* [26], в отличие от фермента из *B. pseudocalcaliphilus* 20RF, который сохранял 90% своей активности в присутствии 15 mM Cu²⁺ [40]. В настоящей работе была проведена сравнительная

оценка влияния сульфата и хлорида меди на активность ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1. В обоих случаях катионы Cu²⁺ оказывали ингибирующее действие на фермент, однако, в присутствии сульфата меди циклизующая активность фермента была почти на 10% ниже, чем в случае с хлоридом (данные не представлены). Таким образом, можно предположить, что катионы металлов в сочетании с SO₄²⁻-анионом оказывают более сильное дестабилизирующее действие на фермент по сравнению с хлоридами тех же металлов. Сходные результаты были получены для ЦГТаза штамма *Bacillus* sp. G1 при использовании соответствующих солей цинка, двухвалентного железа и калия [14]. Имеются данные, что анионы не-

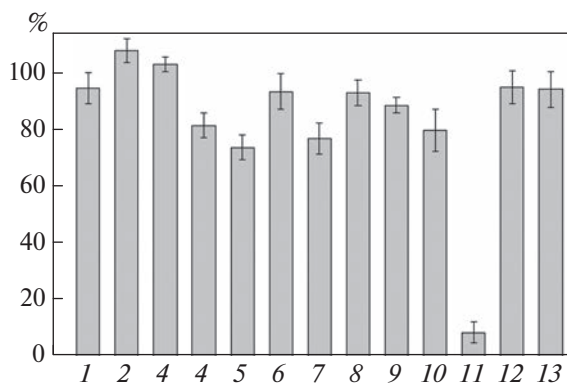


Рис. 7. Влияние катионов металлов на активность очищенной ЦГТазы *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1. Концентрация солей металлов 5 мМ в 0.1 М натрий-фосфатном буфере (рН 8.0). 1 – NiCl₂, 2 – CaCl₂, 3 – MgSO₄, 4 – FeSO₄, 5 – CuSO₄, 6 – PbSO₄, 7 – ZnSO₄, 8 – MnSO₄, 9 – FeCl₃, 10 – CuCl₂, 11 – AgNO₃, 12 – K₂SO₄, 13 – Na₂SO₄. На оси абсцисс – остаточная активность фермента в % от активности в отсутствие солей (100%).

органических кислот также могут играть значительную роль в стабилизации ЦГТазы [14, 46].

Катионы Ni⁺, Pb⁺, Mn²⁺, Na⁺ и K⁺ не оказывали существенного влияния на циклизующую активность ЦГТазы *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 (рис. 7). Активность очищенного фермента достоверно возрастала в присутствии катионов кальция (5 мМ CaCl₂), что является распространенным явлением среди ЦГТаз [26]. Катионы Mg²⁺, при концентрации 5 мМ, также стимулировали активность ЦГТазы *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1, в отличие от аналогичных ферментов *Bacillus* sp. G1 и *B. pseudocaliphilus* 20RF, активность которых снижалась в присутствии сернокислого магния на 55 [14] и 45% [40] соответственно. Активность ЦГТазы *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 катионами кальция и магния наблюдалась при концентрациях последних 5–10 мМ, однако при 15 мМ отмечалось ингибирование фермента солями обоих металлов на 35–37%.

Важнейшей характеристикой ЦГТаз является их специфичность в отношении спектра ЦД, образующихся при ферментативной конверсии крахмала. Определяющее значение для эффективности реакции, катализируемой ЦГТазой *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1, имеет количество фермента в реакционной смеси. С увеличением концентрации фермента в реакционной смеси от 1 до 4 ед./г субстрата общий выход ЦД достигал максимума 42%, однако при дальнейшем увеличении концентрации фермента до 7–15 ед./г продукция ЦД резко снижалась до 26% от содержания субстрата (табл. 2). При избытке фермента в его действии начинала преобладать реакция диспропорционирования с образованием линейных мальтоолигосахаридов, что приводило к резкому снижению выхода ЦД. Эффективность конверсии крахмала в ЦД заметно снижалась также в присутствии низких концентраций ЦГТазы (0.2 ед./г), что обусловлено низкой скоростью ферментативной реакции в условиях полного насыщения фермента субстратом.

Таким образом, для получения удовлетворительного выхода ЦД количество добавляемого фермента необходимо оптимизировать. Полученные данные свидетельствовали, что оптимальной для трансформации крахмала в ЦД можно считать концентрацию ЦГТазы в диапазоне 1–4 ед./г субстрата. Действие исследуемой ЦГТазы на 3%-ный картофельный крахмал при 60°C и концентрации 1 ед./г субстрата приводило к одновременному накоплению α-, β- и γ-ЦД в соотношении 38.8 : 52.6 : 8.6 (мас. %) соответственно и выходу 42%, при этом реакция фактически прекращалась через 10–12 ч. По своим каталитическим свойствам ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 была сопоставима с ЦГТазой из *Geobacillus stearothermophilus* ET1 и *G. thermoglucosidans* CHB1, которые продуцировали смесь α-, β- и γ-ЦД в соотношении 37.8 : 53.1 : 9.1 (мас. %) [47] и 32 : 56.2 : 11.8 (мас. %) [48] соответственно. При этом для ЦГТазы из *G. stearothermophilus* ET1 общий выход ЦД составлял 44% после 12 ч обработки клейстеризованного кукурузного крахмала при 60°C и рН 6.0, а для

Таблица 2. Влияние концентрации ЦГТазы *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 на продукцию ЦД из 3%-ного картофельного крахмала

Концентрация ЦГТазы, ед./г	Выход, мас. %			Общий выход ЦД, %
	α-ЦД	β-ЦД	γ-ЦД	
0.2	45.1	45.8	9.1	19.4
1.0	38.8	52.6	8.6	42.2
4.0	36.4	52.6	11	41.5
7.0	36.4	53.8	9.8	26.07
10	36.9	52.8	10.3	26.5
15	41.8	47.4	10.8	29.46

фермента из *G. thermoglucosidans* СНВ1 60.3% после 21 ч обработки 3%-ного растворимого картофельного крахмала при 60°C и pH 6.0.

Таким образом, в представленной работе впервые дана характеристика свойств ЦГТаза, продуцируемой новым термоалкалотолерантным штаммом вида *C. mannaniycticus* IB-OR17-B1 — представителя рода *Caldalkalibacillus*, составляющего отдельный кластер алкалофильных эндоспорообразующих бактерий. Для выделения данного фермента в электрофоретически гомогенном состоянии успешно использована простая двухэтапная схема очистки, включающая ультрафильтрацию и адсорбцию на кукурузном крахмале. Молекулярная масса очищенного фермента близка значениям некоторых ранее описанных ЦГТаз и составляла около 70 кДа. Фермент показывал наибольшую активность при pH 8.0 и 60°C, был стабилен в интервале pH 7–10 и температуры 65–70°C. Катионы кальция и магния в концентрациях 5–10 мМ существенно увеличивали термостабильность ЦГТаза при 70°C, а также активировали сам фермент. Сильное ингибирование фермента отмечалось в присутствии ионов серебра (5 мМ), тогда как катионы меди, цинка, двух- и трехвалентного железа характеризовались умеренным или незначительным ингибирующим действием на активность ЦГТаза. Достигаемый уровень ферментативной конверсии картофельного крахмала в ЦД — 42% с преимущественным образованием α - и β -ЦД (38.8 и 52.6 мас. %, соответственно) и незначительным количеством γ -ЦД (8.6 мас. %) после 24 ч инкубации дает основания рассматривать ЦГТаза *C. mannaniycticus* IB-OR17-B1 в качестве перспективного кандидата для разработки технологии получения ЦД. Несомненно, термостабильность и алкалотолерантность исследованного фермента позволила также внести штамм *C. mannaniycticus* IB-OR17-B1 в список потенциальных доноров гена ЦГТаза при создании генетически модифицированных продуцентов, либо его использования в качестве одного из базовых продуцентов для дальнейшей селекции.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России по теме № 220131100163-4 “Межвидовые взаимодействия в микробных сообществах и растительно-микробных ассоциациях естественных и техногенных экосистем (генетические, биохимические и биотехнологические аспекты)”.

При проведении исследований использовали оборудование ЦКП “Агидель” УФИЦ РАН.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jemli S., Messaoud E., Ayadi-Zouari D., Naili B., Khe-makhem B., Bejar S. // Biochem. Eng. J. 2007. V. 34. № 1. P. 44–50.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.11.016>
2. Aroob I., Ahmad N., Rashid N. // Amylase. 2021. V. 5. № 1. P. 23–37.
<https://doi.org/10.1515/amylase-2021-0003>
3. Kurkov S.V., Lofsson T. // Int. J. Pharm. 2013. V. 453. № 1. P. 167–180.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.055>
4. Astray G., Gonzalez-Barreiro C., Mejuto J., Rial-Otero R., Simal-Gándara J. // Food Hydrocoll. 2009. V. 23. № 7. P. 1631–1640.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.001>
5. Abdel-Naby M.A., El-Refai H.A., Abdel-Fattah A.F. // J. Appl. Microbiol. 2011. V. 111. № 5. P. 1129–1137.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05136.x>
6. Szejtli J. Cyclodextrin Technology — Topics in Inclusion Science. / Netherlands: Springer Science & Business Media, 2013. 450 p.
<https://doi.org/10.1007/978-94-015-7797-7>
7. Czinkoczek R., Nemeth A. // Hung. J. Ind. Chem. 2019. V. 47. № 2. P. 5–10.
<https://doi.org/10.33927/hjic-2019-14>
8. Hamoudi M., Fattal E., Gueutina C., Nicolas V., Bochota A. // Int. J. Pharm. 2011. V. 416. № 2. P. 507–514.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.062>
9. Marcon F., Mathiron D., Pilard S., Lemaire-Hurtel A., Dubaele J., Djedaini-Pilard F. // Int. J. Pharm. 2009. V. 379. № 2. P. 244–250.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.05.029>
10. Sian H.K., Said M., Hassan O., Kamaruddin K., Ismail A.F., Rahman R. et al. // Process Biochem. 2005. V. 40. № 3–4. P. 1101–1111.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.03.018>
11. Wang J., Cao Y., Sun B., Wang C. // Food Chem. 2011. V. 127. № 4. P. 1680–1685.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.036>
12. Lim C.H., Rasti B., Sulisty J., Hamid M.A. // Heliyon. 2021. V. 7. e06305.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06305>
13. Saini K., Pathak V.M., Tyagi A., Gupta R. // Catalysis Research. 2022. V. 2. № 3.
<https://doi.org/10.21926/cr.2203029>
14. Zhao F., Li Y., Li C., Ban X., Gu Z., Li Z. // Food Hydrocolloids. 2022. V. 133. № 1. 107951.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107951>
15. Zhou J., Feng Z., Liu S., Wei F., Shi Y., Zhao L. et al. // Mol. Plant Pathol. 2021. V. 22. № 1. P. 130–144.
<https://doi.org/10.1111/mpp.13014>
16. Biwer A., Antranikian G., Heinzle E. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 59. № 6. P. 609–617.
<https://doi.org/10.1007/s00253-002-1057-x>

17. Zheng M., Endo T., Zimmermann W. // Aust. J. Chem. 2002. V. 55. № 2. P. 39–48.
<https://doi.org/10.1071/CH01189>
18. Li C., Ahn H.J., Kim J.H., Kim Y.W. // Carbohydr. Polym. 2014. V. 99. P. 39–46.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.056>
19. Saini K., Pathak V.M., Tyagi A., Gupta R. // Catalysis Research. 2022. V. 2. № 3: 029. P. 1–56.
<https://doi.org/10.21926/cr.2203029>
20. Melentiev A.I., Galimzianova N.F., Gilvanova E.A., Shchelchkova E.A., Kuzmina L.Yu., Boyko T.F. et al. // Adv. Microbiol. 2014. V. 4. № 8. P. 455–464.
<https://doi.org/10.4236/aim.2014.48050>
21. Gupta R.S., Patel S., Saini N., Chen S. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. № 11. P. 5753–5798.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>
22. Yoon S.H., Ha S.M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H. et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. № 5. P. 1613–1617.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
23. Adebule A.P. // J. Adv. Med. Life Sci. 2018. V. 6. № 3. P. 1–3.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.1198928>
24. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
25. Felsenstein J. // Evolution. 1985. V. 39. № 4. P. 783–791.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
26. Martins R.F., Hatti-Kaul R. // Enzyme Microb. Technol. 2002. V. 30. № 1. P. 116–124.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00461-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00461-6)
27. Usanov N.G., Gil'vanova E.A., Eli'zarev P.A., Prutsakova E.A., Melent'ev A.I. // Appl. Biochem. Microbiol. 2007. V. 43. № 1. P. 105–110.
<https://doi.org/10.1134/S000368380701019X>
28. Tilden E.B., Hudson G.S. // J. Bacteriol. 1942. V. 43. № 4. P. 527–544.
<https://doi.org/10.1128/jb.43.4.527-544.1942>
29. Neuhoﬀ V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W. // Electrophoresis. 1988. V. 9. № 6. P. 255–262.
<https://doi.org/10.1002/elps.1150090603>
30. Доусон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К. Справочник биохимика: Перевод с англ. / М.: Мир, 1991. 544 с.
31. Nogi Y., Takami H., Horikoshi K. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. V. 55. № 6. P. 2309–2315.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.63649-0>
32. Xue Y., Zhang X., Zhou C., Zhao Y., Cowan D.A., Heaphy S. et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. № 6. P. 1217–1221.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.64105-0>
33. Zhao W., Zhang C.L., Romanek C.S., Wiegand J. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. № 5. P. 1106–1108.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.65363-0>
34. de Jong S.I., van den Broek M.A., Merkel A.Y., de la Torre Cortes P., Kalamorz F., Cook G.M. et al. // Extremophiles. 2020. V. 24. № 6. P. 923–935.
<https://doi.org/10.1007/s00792-020-01205-w>
35. Yampayont P., Iizuka M., Ito K., Limpaseni T. // J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 2006. V. 56. № 1–2. P. 203–207.
<https://doi.org/10.1007/s10847-006-9084-3>
36. Alves-Prado H.F., Carneiro A.A.J., Pavezzi F.C., Gomes E., Boscolo M., Franco C.M.L. et al. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2008. V. 146. № 1–3. P. 3–13.
<https://doi.org/10.1007/s12010-007-8093-z>
37. Savergave L.S., Dhule S.S., Jogdand V.V., Nene S.N., Gadre R.V. // Biochem. Eng. J. 2008. V. 39. № 3. P. 510–515.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.09.020>
38. More S.S., Niraja R., Evelyn C., Byadgi A.M., Shweta V., Mangaraj S.D. // Croatian J. Food Technol. Biotechnol. Nutrit. 2012. V. 7. № 1–2. P. 90–97.
39. Reddy S.V., More S.S., Annappa G.S. // J. Basic Microbiol. 2017. V. 57. № 11. P. 974–981.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201700270>
40. Atanasova N., Kitayska T., Bojadjeva I., Yankov D., Tonkova A. // Process Biochem. 2011. V. 46. № 1. P. 116–122.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.027>
41. Cao X., Jin Z., Chen F., Wang X. // J. Food Biochem. 2005. V. 28. № 6. P. 463–475.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2004.04603.x>
42. Kitayska T., Petrova P., Ivanova V., Tonkova A. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2011. V. 165. № 5–6. P. 1285–1295.
<https://doi.org/10.1007/s12010-011-9346-4>
43. Fujita Y., Tsubouchi H., Inagi Y., Tomita K., Ozaki A., Nakanishi K. // J. Ferment. Bioeng. 1990. V. 70. № 3. P. 150–154.
[https://doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90174-U](https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90174-U)
44. Yim D.G., Sato H.H., Park Y.H., Park Y.K. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 18. № 6. P. 402–405.
<https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900400>
45. Higuti I.H., Grande S.W., Sacco R., Jose do Nascimento A. // Braz. Arch. Biol. Technol. 2003. V. 46. № 2. P. 183–186.
<https://doi.org/10.1590/S1516-89132003000200007>
46. Li C., Chen S., Gu Z., Hong Y., Cheng L., Li Z. // Food Biosci. 2018. V. 26. P. 139–144.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.10.006>
47. Chung H.-J., Yoon S.-H., Kim M.-J., Kweon K.-S., Lee I.-W., Kim J.-W. et al. // J. Agric. Food Chem. 1998. V. 46. № 3. P. 952–959.
<https://doi.org/10.1021/jf970707d>
48. Jia X., Ye X., Chen J., Lin X., Vasseur L., You M. // Starch – Starke. 2017. V. 70. № 1–2.
<https://doi.org/10.1002/star.201700016>

Cyclodextrin Glucanotransferase of Alkalophilic Strain *Caldalkalibacillus mannanilyticus* IB-OR17-B1

P. Yu. Milman^a, E. A. Gilvanova^a, and G. E. Aktuganov^a, *

^a Institute of Biology of Ufa Federal Research Centre of the RAS, Ufa, 450054 Russia

*e-mail: gleakt@anrb.ru

Extracellular cyclodextrin glucanotransferase (CGTase, K.F.2.1.19) was characterized for the first time in a strain of bacteria of the species *Caldalkalibacillus mannanilyticus* IB-OR17-B1. The enzyme was isolated from the culture supernatant using ultrafiltration and affinity adsorption on corn starch. The specific activity of the CGTase was increased in 18-fold as a result of purification with the enzyme yield 56%. The molecular mass of the purified enzyme was 70 kDa according to the denaturing electrophoresis in polyacrylamide gel. The CGTase of *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 demonstrated a maximal cyclizing activity under pH 8 and temperature 60°C, respectively, and it was stable in the pH range 7–10 and temperatures ≤70°C. The thermal stability of the enzyme under 70°C increased by 10–15% in the presence 5–10 mM of calcium and magnesium salts. The cations of Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ and Fe³⁺ in concentration 5 mM inhibited a CGTase activity by 90, 26, 23, 18 and 11%, respectively. The purified CGTase under optimal conditions and enzyme-substrate ratio 1 U/g converted a potato starch during 24 h to mixture of α-, β- and γ-cyclodextrins with mass ratio 38.8 : 52.6 : 8.6 and yield 42%.

Keywords: cyclodextrin glucanotransferase, cyclodextrins, *Caldalkalibacillus mannanilyticus*, alkalophilic bacteria, thermostable enzyme