

УДК 577.152.32

ПОЧВЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ – ПРОДУЦЕНТЫ ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗ

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

Аннотация

Проведен скрининг почвенных микроорганизмов-продуцентов циклодекстринглюканотрансфераз (ЦГТаз) (КФ 2.4.1.19). Предложен экспресс-тест для скрининга продуцентов ЦГТаз. Проведена селекция штаммов методом мутагенеза. В результате проведенных исследований получены новые продуценты ЦГТаз.

Введение

Макроциклические олигосахариды – циклодекстрины (ЦД), благодаря исключительной способности к образованию комплексов включений с органическими и неорганическими соединениями, широко используются в различных сферах практической деятельности человека, в частности: пищевой, химической промышленности, сельском хозяйстве и медицине. Это обуславливает повышенный интерес к вопросам их производства.

Синтез ЦД представляет собой реакцию трансгликозилирования, в которой в качестве субстрата используется крахмал из различных источников – пшеницы, кукурузы, картофеля и др., а ферментом служит циклизующая 1,4- α -D-глюкан-4- α (1,4- α -глюкано)-трансфераза (ЦГТаза) (КФ 2.4.1.19).

ЦГТаза – фермент микробного происхождения, и получение этого фермента является ключевым этапом при производстве ЦД. Поэтому актуальным является выделение продуцента ЦГТаза, который синтезирует фермент с высокой каталитической активностью и специфичностью.

К настоящему моменту ЦГТаза с различными свойствами обнаружена у почвенных микроорганизмов разных родов (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Micrococcus*, *Thermoanaerobacter* и др.) [1–3]. Эти продуценты ЦГТаз относятся к группам мезофильных, термофильных либо алкалофильных бактерий. В результате дальнейших исследований ЦГТаза впервые была идентифицирована у галофильных спорообразующих бацилл и термоактиномицетов [4]. Различают α -, β - и γ -специфичные ЦГТазы, которые из крахмала синтезируют в α -, β - и γ -ЦД. Каждая ЦГТаза обладает только ей присущими свойствами, которые могут быть похожими в рамках видовой специфичности микроорганизмов – продуцентов [5].

Большинство известных продуцентов ЦГТаз секретирует внеклеточный фермент, но единого мнения у авторов о внутри- и внеклеточной локализации ЦГТаза нет [1, 6]. Для производства ЦД предпочтительнее использовать микроорганизмы – продуценты, которые секретируют ЦГТазу в культуральную

среду. Штаммы, пригодные для промышленности, должны быстро развиваться в больших ферментерах, образовывать минимальное количество других ферментов, не должны выделять токсичные метаболиты и не должны быть патогенными [7].

Выявление новых микроорганизмов, секретирующих ЦГТазу, их селекция, даст возможность отобрать наиболее технологичные продуценты этого фермента с целью увеличения выхода и направленного получения того или иного гомолога ЦД.

Целью настоящей работы было выделение микроорганизмов – продуцентов ЦГТаз.

Для достижения поставленной цели необходимо было провести:

1. скрининг микроорганизмов – продуцентов ЦГТаз;
2. селекцию штаммов – продуцентов β -ЦГТаз с помощью индуцированного мутагенеза под действием УФ излучения.

1. Материалы и методы исследований

1.1. Материалы. В качестве природных источников новых продуцентов ЦГТаз использовали образцы почвы из различных регионов Республики Татарстан:

- почва из цехов ООО «Крахмалопатока» (серия К);
- почва лесной подстилки Раифского заповедника (серия М);
- окультуренная почва с картофельных (серии А, В, Д) и свекольных (серия С) полей Бирюлинского и Атнинского районов.

В качестве положительного контроля на ЦГТазу использовали штамм *Bacillus sp. 6.6.3*, любезно предоставленный авторами-сотрудниками Института биологии УНЦ РАН г. Уфа.

Все реактивы, использованные для выращивания культур, определения активности и специфичности ЦГТаз, были марки Ч.Д.А. и Х.Ч., кроме картофельного и кукурузного крахмала (Казанский завод «Крахмалопатока»), дрожжевого автолизата (Serva), пептона (Framenia).

В качестве стандартной питательной среды использовали среду К-1 (г/л): растворимый крахмал – 10; дрожжевой автолизат – 3.0; пептон – 3.0; кукурузный экстракт – 3.0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 2.0; KH_2PO_4 – 2.0; CaCO_3 – 5.0; дистиллированная H_2O – до 1 л, pH среды – 7.4–7.6. Твердая среда К-1: тот же состав, но с добавлением агара – 20 г/л. [8]. Картофельная среда [9]. Индикаторная среда: 0.1 М натрий-ацетатного буфера (pH 6.0), 3% крахмала, 2% агара, 0.01%-ный спиртовой раствор фенолфталеина.

Среды стерилизовали методом дробного автоклавирования при 0.5 атм в течение 25 мин.

1.2. Методы исследований.

Культивирование микроорганизмов проводили при $+37^\circ\text{C}$ в термостате и на качалке при 200 об./мин. Длительность выращивания 24–72 ч. Биомассу отделяли центрифугированием при 10 тыс. об./мин. в течение 15 мин. Полученную культуральную жидкость (КЖ) использовали для определения декстринирующей и β -ЦГТазной активности.

Скрининг продуцентов ЦГТаз проводили по следующей схеме (рис. 1).

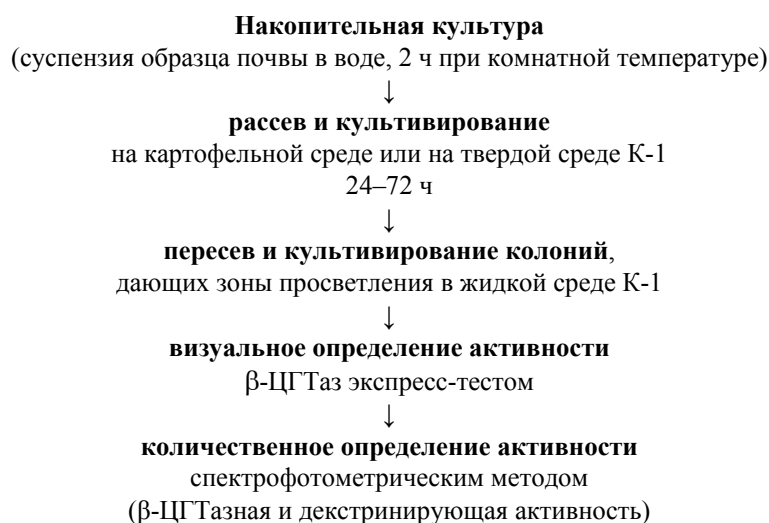


Рис. 1. Схема скрининга продуцентов ЦГТаз

Накопительную культуру получали следующим образом: почву в количестве 1 г размешивали в 1 мл стерильной воды и отстаивали или центрифугировали 10 мин. при 8 тыс. об./мин. Материал из проб накопительной культуры высевали на чашки с картофельной средой или твердой средой К-1, содержащей стрептомицин (50–300 мкг/мл) и выращивали до формирования колоний (24–72 ч). Колонии, вокруг которых имелись зоны просветления за счет гидролиза крахмала, пересевали в пробирки с жидкой средой К-1.

Предварительный отбор изолятов проводили с помощью экспресс-теста на чашках с индикаторной средой. Суть теста основана на свойстве β-ЦД в щелочных условиях образовывать бесцветные комплексы с фенолфталеином. В качестве субстрата для определения активности ЦГТазы использовали 3%-ный растворимый крахмал, иммобилизованный в твердый носитель агарозу или агар-агар. Исследуемые образцы КЖ наносили в количестве 5–10 мкл на поверхность геля и инкубировали в течение 30 мин. Затем чашки выдерживали 5 мин. в парах аммиака (рН 14) и отбирали изоляты, образующие светлые зоны на фоне пурпурной окраски геля, которую дает фенолфталеин в щелочных условиях. Зоны просветления свидетельствуют о наличии комплекса ЦД с фенолфталеином [10].

Определение активности ЦГТазы и количество β-ЦД проводили спектрофотометрическим фенолфталеиновым методом Кестнера [11]. Метод основан на изменении светопоглощения при образовании в щелочном окрашенном растворе бесцветного комплекса фенолфталеина с β-ЦД. В качестве субстрата использовали 3%-ный раствор растворимого картофельного крахмала в 0.1 М натрий-ацетатном буфере, рН 6.0.; в качестве фермента использовали КЖ. За единицу активности фермента принимали количество фермента, катализирую-

щего образование 1 мкл β -ЦД в течение минуты в указанных условиях реакции.

Определение декстринирующей активности ЦГТаза проводили по методу N. Nakamura в модификации Д.А. Волковой [6]. За единицу декстринирующей активности принимали такое количество фермента, которое в течение 1 мин. вызывает 10%-ное снижение оптической плотности амилозо-йодного комплекса в условиях опыта.

Специфичность ЦГТаза определяли модифицированным тестом Тильдена – Хадсона, который основан на формировании кристаллов ЦД. После экспозиции капли реакционной смеси на предметном стекле в йодной камере по характеру кристаллообразования судили о специфичности исследуемых культур [8].

Для определения таксономической принадлежности выделенных изолятов изучали их морфологические и цитологические свойства. Для этого проводили окраску клеток по Граму; определяли размер, форму, профиль, край колоний с помощью лупы и микроскопии; размер клеток и спорообразование изучали с помощью фазово-контрастного микроскопа, используя окулярный микроскоп [12].

Мутагенез проводили по методу Дж. Миллера [13] с некоторыми модификациями. Клетки ночной культуры микроорганизмов собирали 10 мин. центрифугированием при 4 тыс. об./мин., осадок суспендировали в 10 мл 0.1 М натрий-фосфатного буфера и снова осаждали центрифугированием. Надосадочную жидкость сливали и ресуспендировали клетки в 60 мл 0.1 М натрий-фосфатного буфера (рН 7.0) до получения гомогенной суспензии. 3 мл суспензии отбирали и измеряли ее оптическую плотность при длине волны 600 нм против натрий фосфатного буфера. Суспензию клеток разбавляли буфером до оптической плотности 0.1–0.12, соответствующей концентрации клеток $1.5\text{--}1.8 \times 10^9$ кл./мл. Суспензию в объеме 0.1 мл переносили в пробирку с 0.9 мл среды LB, делали 5 десятикратных разведений и пересеивали их на чашки с твердой средой К-1. Отбирали 12 мл той же суспензии и разливали в 4 чашки Петри по 3 мл. Пробы облучали УФ лучами (12×10^3 эрг/см² с) в течение 20, 40, 60, 80 с. Отбрав по 1.0 мл, облученную суспензию переносили в пробирки с 0.5 мл среды LB и инкубировали в термостате (+37°C, 1 ч) для фиксации мутации (такую операцию проделали с суспензией в каждой чашке). После инкубации делали 4 десятикратных разведения каждой облученной суспензии, засеивали на чашки со средой К-1 и отбирали клоны, проявляющие β -ЦГТазную активность.

2. Результаты исследований и обсуждение

2.1. Скрининг бактерий, выделенных из почвенных образцов. Скрининг микроорганизмов проводили с целью выделения штамма, продуцирующего внеклеточную ЦГТазу с технологическими свойствами.

Первичный отбор продуцентов ЦГТаз проводили, ориентируясь на то обстоятельство, что когда колонии микроорганизмов развиваются на агаризованной среде, содержащей частицы нерастворимых макромолекулярных субстратов, подвергающихся перевариванию, каждая колония бывает окружена свет-

Табл. 1

Некоторые продуценты ЦГТаз, выделенные в результате скрининга

№	Серия, номер штамма	Активность β -ЦГТазы, ед./мл КЖ	Количественное содержание белка, мг	Удел. активность ЦГТазы, ед./мг белка
1	A-1-7	0.16	11	1.45×10^{-2}
2	A-5	0.13	8.7	1.48×10^{-2}
3	B-9	0.16	10	1.60×10^{-2}
4	C-7-1	0.14	18	0.78×10^{-2}
5	D-6-2	0.13	11	1.17×10^{-2}
6	K-11	0.07	8	0.80×10^{-2}
7	M-5-2	0.12	9	1.30×10^{-2}
8	<i>Bacillus sp.</i> 633	0.12	15	0.80×10^{-2}

лой зоной. Эта зона представляет собой субстрат (крахмал), гидролизованный экзоферментами (амилолитическими ферментами). В результате проведенного скрининга микроорганизмов было отобрано около 400 изолятов, которые давали зоны просветления на картофельной среде. Чтобы отличить штаммы, продуцирующие амилазы, которые тоже дают зоны просветления, выделенные изоляты подвергались дальнейшему анализу с помощью экспресс-теста. По положительной реакции на ЦГТазу было отобрано 89 изолятов из 6 серий образцов почвы.

По литературным данным известно, что β -ЦД и их производные находят более широкое применение в различных областях народного хозяйства благодаря своим уникальным комплексообразующим свойствам. Поэтому для нас интерес представляли изоляты, которые обладали β -ЦГТазной активностью. В результате проведенных экспериментов было установлено, что 49 из 89 изолятов обладали β -ЦГТазной активностью, которая варьировалась в пределах 0.04–0.16 ед./мл (табл. 1).

При культивировании изолятов в жидкой среде β -ЦГТазная активность самых активных изолятов находилась на уровне 0.14–0.16 единиц активности фермента на мл культуральной жидкости.

Таким образом, исследования показали, что бактерии, продуцирующие β -ЦГТазу, не являются эндемичными и могут быть выделены практически из любого образца лесной, луговой и окультуренной почвы. Наши результаты не противоречат данным литературы [3, 8, 15–17].

Из литературных данных известно, что большинство продуцентов бактериальных ЦГТаз синтезируют и другие ферменты амилолитического комплекса, которые гидролизуют крахмал. Для того чтобы отобрать продуцентов ЦГТаз, в культуральной жидкости определяли декстринирующую и циклизующую активности и специфичность ЦГТаз. Как видно из табл. 2, проанализированные изоляты обладают и декстринирующей, и циклизующей активностью. При этом они образуют как α -, так и β -ЦД, причем изоляты C-7-1 и K-11 преимущественно синтезируют β -ЦД.

С целью отбора наиболее активного продуцента ЦГТазы была изучена динамика накопления β -ЦД в культуральной жидкости изолятов (рис. 2).

Табл. 2

Изучение активности и специфичности ЦГТазы некоторых изолятов

№	Серия, номер штамма	Декстринирующая активность, ед./мг	Специфичность ЦГТазы	β -ЦГТазная активность, ед./мл
1	А-1-7	0.98	α, β	0.16
2	А-5	2.01	α, β	0.13
3	В-9	0.75	α, β	0.16
4	С-7-1	0.97	$\alpha < \beta$	0.14
5	Д-6-2	1.00	$\alpha > \beta$	0.13
6	К-11	1.02	$\alpha < \beta$	0.07
7	М-5-2	0.98	α, β	0.12

Было установлено, что в культуральной жидкости изолята С-7-1 большое количество β -ЦД достигается уже через 24 ч культивирования, в то время как у музейного штамма *Vacillus sp.663* наибольшее количество β -ЦД наблюдается только через 72 ч (и составляет 22.46 мг/л). Через 48 ч культивирования у всех изолятов образуется большое количество ЦД (19.8–30.3 мг/л). К 72 ч количественное содержание β -ЦД у изолятов А-1-7 и С-7-1 не изменяется, а максимальное количество наблюдается у изолята В-9 и достигает 30.34 мг/л.

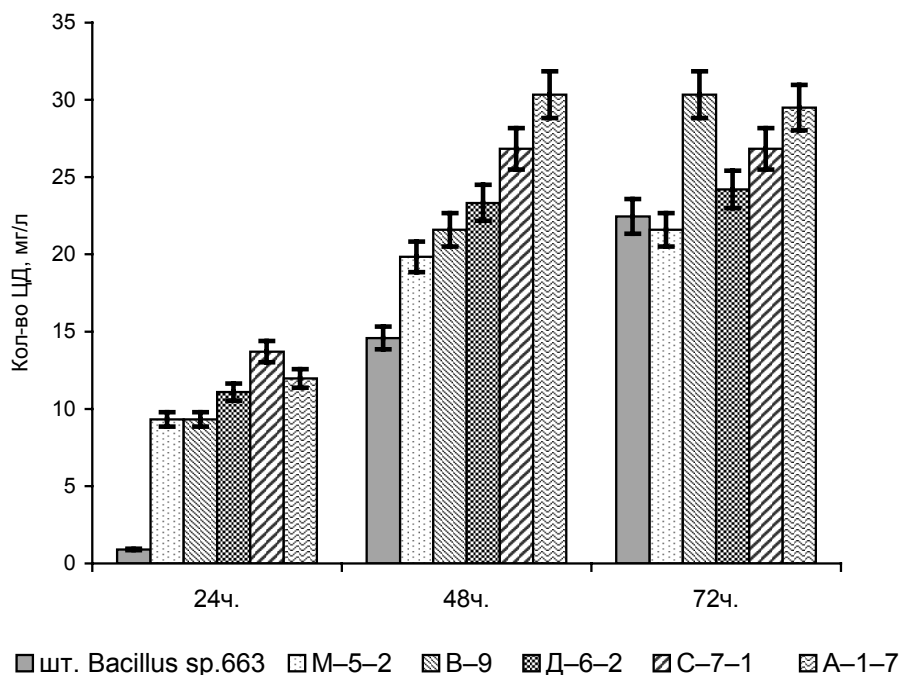


Рис. 2. Динамика накопления ЦД

Для определения таксономического положения наиболее активных изолятов провели изучение некоторых морфологических и цитологических свойств. Установлено, что все изоляты являются подвижными аэробными бактериями палочковидной формы. Размеры клеток в пределах $0.24 \times 2.47 - 0.57 \times 4.09$; ок-

раска по Граму – вариабельна, спорообразование наблюдали у изолятов А-1-7, В-9 и С-7-1, которых отнесли к роду *Bacillus*.

2.2. Селекция с помощью УФ-облучения. С целью получения более активных штаммов-продуцентов ЦГТаз провели эксперименты по индукции мутаций под действием УФ-облучения.

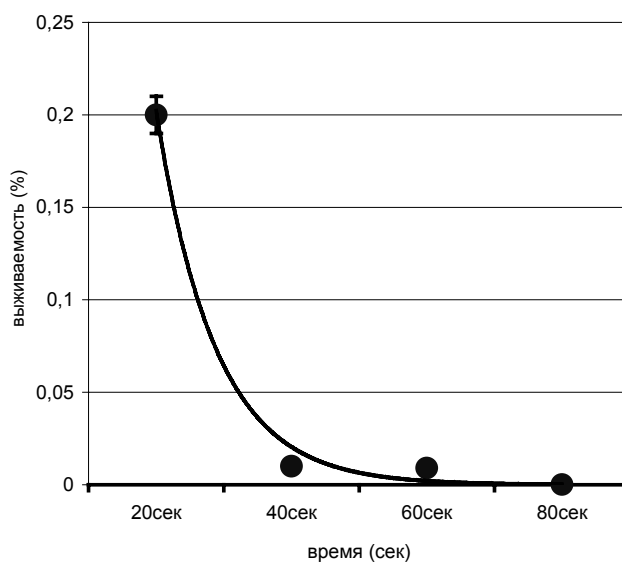


Рис. 3. Влияние Уф-облучения на жизнеспособность клеток *Bacillus sp. C-7-1*

Облучению подвергли штамм *Bacillus sp. C-7-1* с исходной активностью 0.11 ед./мл КЖ (мутанты обозначили серией У). Данный штамм был выбран в связи с тем, что при изучении динамики накопления β -ЦД уже на первые сутки культивирования в культуральной жидкости наблюдалось максимальное количество β -ЦД. В результате исследований установлено, что клетки выделенного нами штамма *Bacillus sp. C-7-1* очень чувствительны к УФ-облучению и уже через 20 с воздействия выживаемость их падает до 0.2%. (рис. 3). В процессе работы нами было получено 216 мутантов. Зоны просветления на элективной среде дали клетки из 42 колоний.

Значения ферментативной активности мутантных клонов существенно колебались в зависимости от времени воздействия УФ-лучей на клетки бактерий. При облучении суспензии клеток в течение 40 секунд были получены мутанты с повышенной β -ЦГТазной активностью. В результате УФ-облучения были получены мутанты (далее серия У), и среди них было отобрано только три штамма, активность которых превышала ЦГТазную активность исходного штамма *Bacillus sp. C-7-1*. Несмотря на то, что штаммы *Bacillus sp. У-4-1* и *Bacillus sp. У-4-3* имели высокую удельную активность, среди них было большое количество ревертантов. Штамм *Bacillus sp. У-4-2* стабильно продуцировал активную внеклеточную ЦГТазу (рис. 4).

Таким образом, в результате скрининга и селекции с помощью УФ-облучения были получены два продуцента, стабильно синтезирующие активную ЦГТазу – штаммы *Bacillus sp.* С-7-1 и *Bacillus sp.* У-4-2.

В настоящее время проводится работа по изучению влияния условий культивирования выделенных штаммов на синтез ЦГТазы и оптимизации условий культивирования микроорганизмов в масштабах промышленного производства.

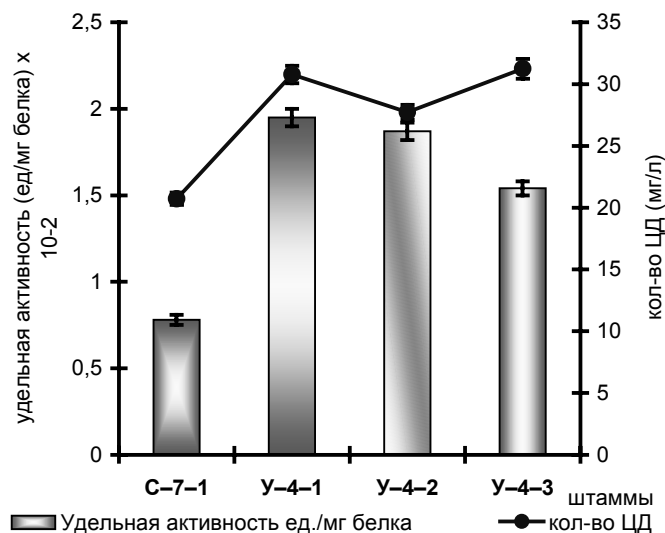


Рис. 4. ЦГТазная активность бактерий после УФ-облучения

Summary

N.N. Kuznetsova, E.V. Nikolaeva, V.G. Vinter. Soil microorganisms – producers cyclodextrineglucotransferases.

The screening of the soil microorganisms – producers of cyclodextrineglucotransferases (CGTases) (KF 2.4.1.19) is carried out. The express-test for the screening of the producers of CGTases is proposed. The selection of strains by the method of mutagenesis is carried out. As a result of the investigations the new producers of CGTases are obtained.

Литература

1. *Szejtli J.* Cyclodextrin technology. – 1988. – P. 26–34.
2. *Бикбулатова С.М. и др.* Установление филогенетического родства различных видов и штаммов микроорганизмов – продуцентов ЦГТаз на основе сравнительного анализа их аминокислотных последовательностей // *Микробиология.* – 2000. – Т. 69, № 5. – С. 686–694.
3. *Абелян В.А. и др.* Цикломальтодекстрин-глиуканотрансферазы из термофильных актиномицетов // *Биохимия.* – 1995. – Т. 60, Вып. 10. – С. 1600–1607.
4. *Абелян В.А. и др.* Особенности получения циклодекстринов с помощью циклодекстринглиуканотрансфераз различных групп микроорганизмов // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2002. – Т. 38, № 6. – С. 616–624.

5. *Абелян В.А. и др.* Модель действия цикломальтодекстрин-глюканотрансферазы галофильных бацилл // Биохимия. – 1995. – Т. 60, Вып. 6. – С. 898–903.
6. *Волкова Д.А. и др.* Получение высокоочищенной циклодекстрин-гликозилтрансферазы из *Bacillus sp.* 1070 // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37, № 2. – С. 156–159.
7. *Прист Ф.* Внеклеточные ферменты микроорганизмов. – М.: Мир, 1987. – С. 83,103.
8. *Терехова Е.Я. и др.* Выделение продуцентов β -специфичный циклодекстринглюканотрансферазы и получение ферментных препаратов на их основе // Автореф. дис. – Уфа, 1999. – С. 3–19.
9. *Егоров Н.С.* Циклодекстрины // Микробиология. – Т. 21. – М.: ВИНТИ, 1988. – С. 41–52.
10. *Кузнецова Н.Н., Николаева Е.В., Винтер В.Г.* Скрининг микроорганизмов – продуцентов циклодекстринглюканотрансфераз // Тр. Объединен. межд. научн. конф. – Казань, 2003. – С. 191–193.
11. *Кёстнер А.И. и др.* Определение активности циклодекстрин-глюканотрансферазы // Прикладная биохимия и микробиология. – 1989. – Т. 25, Вып. 3. – С. 425–430.
12. Практикум по микробиологии / Под ред. *Н.С. Егорова*. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 307 с.
13. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. – М.: Мир, 1976. – 436 с.
14. *Усанов Н.Г., Логинов О.Н., Пруцакова Е.А., Терехова Е.Я.* Выделение *Bacillus macerans* из почвы // Основные направления биотехнологии в решении задач науки и практики. – Уфа: Изд-во БНЦ УрО АН СССР, 1991. – С. 67–71.
15. *Larsen L. et al.* Purification and characterisation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus sp.* F8 // Carbohydrate Research. – 1998. – V. 310. – P. 211–219.
16. *Martins F. et al.* A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterisation // Enzyme and Microbial Technology. – 2002. – V. 30. – P. 116–124.
17. *Shigeharu M. et al.* Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase from *Brevibacterium sp.* No 9605 // Biosci., Biotechnol. and Biochem. – 1994. – V. 58, No 11. – P. 1968–1972.

Поступила в редакцию
25.07.05

Кузнецова Наталья Николаевна – научный сотрудник лаборатории НИИБ-2 Казанского государственного университета.

E-mail: Natalya.Kuznetsova@ksu.ru

Николаева Елена Владиславовна – выпускница кафедры биохимии Казанского государственного университета.

Винтер Виктор Георгиевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии Казанского государственного университета.

E-mail: Viktor.Vinter@ksu.ru