

УДК 577.15:579.6

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

© 2023 г. П. Ю. Мильман<sup>1</sup>, Е. А. Гильванова<sup>1</sup>, Г. Э. Актуганов<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup> 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 ЦГТаза 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<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> и Fe<sup>3+</sup> в концентрации 5 мМ ингибировали ЦГТаза 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 ЦГТаза 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* YURP-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 ЦГТаза катализируют 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;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.1;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0.1; агар – 1.5, рН среды доводили до 7.9–8.0 добавлением 10%-ного стерильного раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Для работы 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 ( $\text{OP}_{600}$ ) 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 Мартинусу [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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\alpha$ - и  $\beta$ -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 ЦГТаза (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 ЦГТаза 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 отсутствие 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 ЦГТаза 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 ЦГТаза 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-

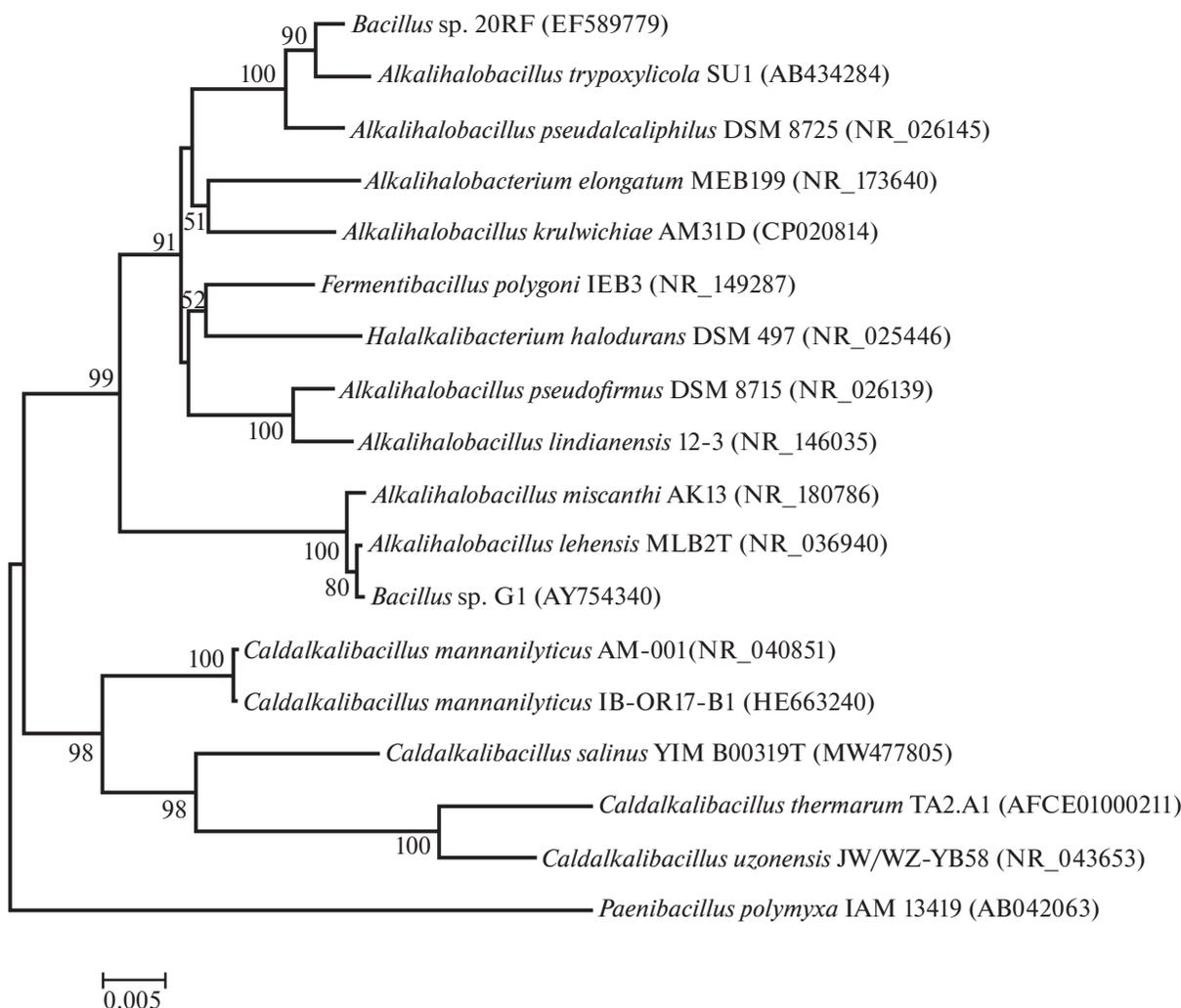
фосфатном буфере (pH 8.0), инкубировали в течение 24 ч при 60°C. После инкубации из реакционной смеси отбирали пробы по 900 мкл в микроцентрифужные пробирки. К каждой из проб в качестве внутреннего стандарта добавляли 90 мкл 10%-ного раствора ксилитозы, затем вносили 990 мкл ацетонитрила и удаляли остатки нетрансформированного крахмала центрифугированием при 8000 об./мин в течение 10 мин на центрифуге CM-50 (“ELMI”, Латвия). Супернатант разделяли на колонке “SEPARON-NH<sub>2</sub>”-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 программного-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  $\beta$ -манназу и хитиназу, а также обладал антагонистической активностью в отношении некоторых фитопатогенных грибов [20]. Однако до настоящего времени не сообща-



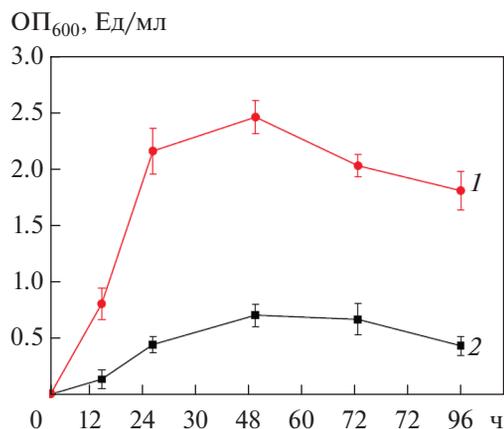
**Рис. 2.** Микрофотография кристаллов ЦД, образующихся при ферментативной трансформации 3%-ного растворимого картофельного крахмала (3 ч, 37°C) ЦГТазой *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1, согласно тесту Тильдена-Хадсона. Стрелки и цифры показывают кристаллы  $\alpha$ - (1) и  $\beta$ -ЦД (2) в виде игл 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  $\beta$ -ЦД, окрашенных в светло-коричневый цвет и резко отличающихся от иглообразных друз, характерных для комплекса  $\alpha$ -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-производителя [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

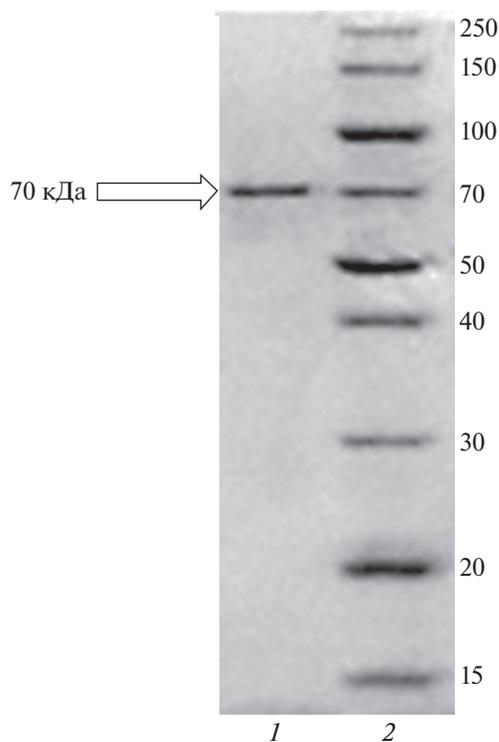
воначальной активности в интервале рН 7–10. Очищенный фермент был более стабилен при щелочных значениях рН, теряя около 50% первоначальной активности при рН > 10, тогда как при рН < 7.0 полуинактивация фермента наблюдалась уже при рН ~ 5.5–5.6 (рис. 6а). Максимальная скорость конверсии крахмала ЦГТазой *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

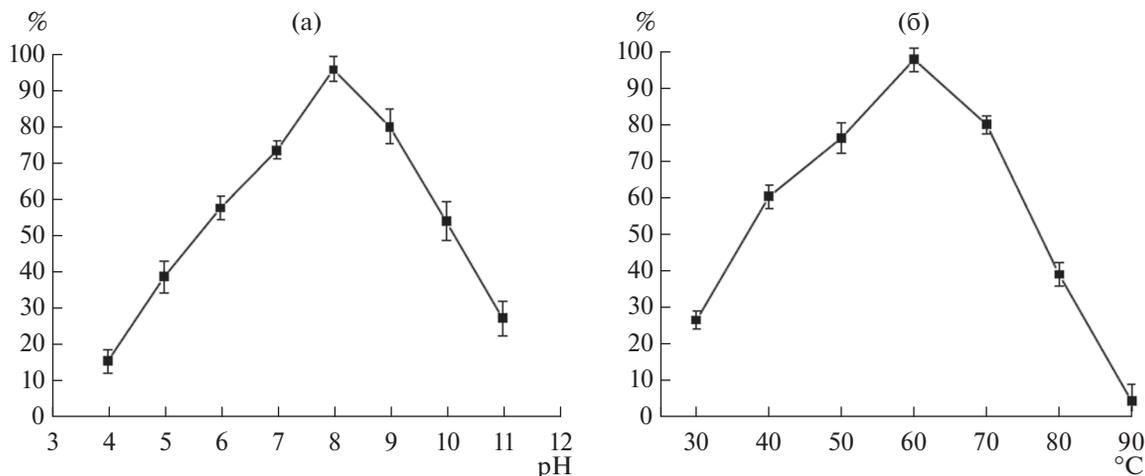
остаточная активность при 70°C составляла 31% после 30-минутной термообработки [40]. Охарактеризованные ранее ЦГТаза других видов алкалофильных бактерий отличались еще меньшей термостабильностью, сохраняя первоначальную активность при температурах не более 45–55°C [40]. Термостабильность ЦГТаза *C. mannanilyticus* 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 рН 7–10 и температурах 60–70°C, что является существенным фактором в выборе фермента для производства ЦД.

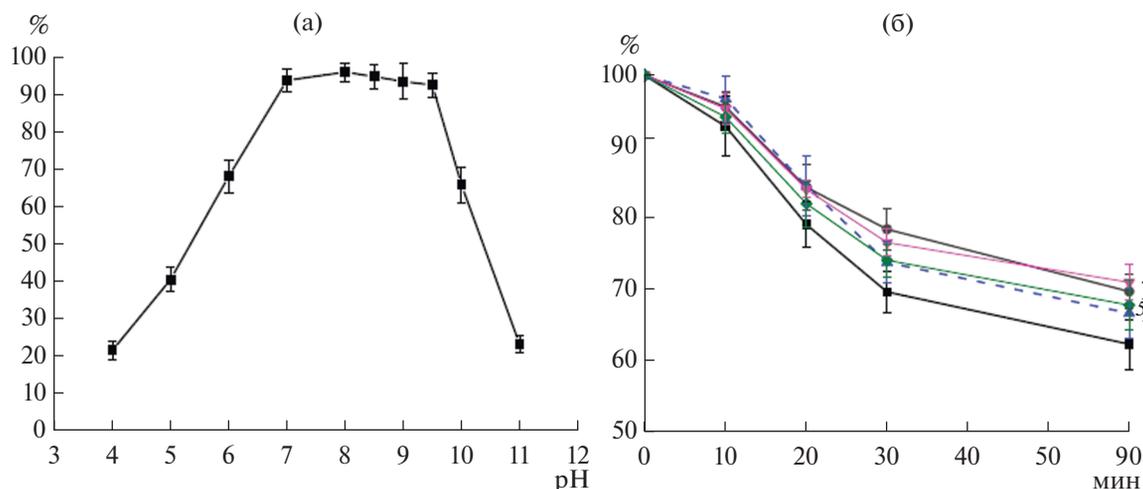
Влияние ионов металлов на ЦГТаза различного происхождения может носить как ингибирующий, так и активирующий характер. Катионы металлов зачастую необходимы для поддержания активной конформации многих ферментов [38]. Нами была проведена оценка влияния солей разных групп металлов в концентрации 5 мМ на 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).



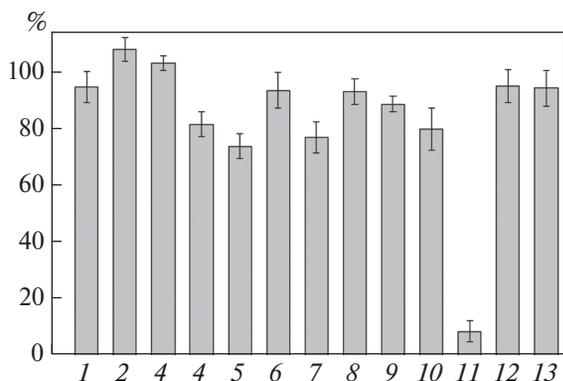
**Рис. 5.** Влияние pH (а) и температуры (б) на активность очищенной ЦГТаза (%) *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1. (Активность фермента в % от максимального значения).



**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 CaCl<sub>2</sub>; 4, 5 – 5 и 10 mM MgSO<sub>4</sub>. 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 ЦГТаза, 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 Cu<sup>2+</sup> [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 Cu<sup>2+</sup> 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 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-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 – NiCl<sub>2</sub>, 2 – CaCl<sub>2</sub>, 3 – MgSO<sub>4</sub>, 4 – FeSO<sub>4</sub>, 5 – CuSO<sub>4</sub>, 6 – PbSO<sub>4</sub>, 7 – ZnSO<sub>4</sub>, 8 – MnSO<sub>4</sub>, 9 – FeCl<sub>3</sub>, 10 – CuCl<sub>2</sub>, 11 – AgNO<sub>3</sub>, 12 – K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 13 – Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 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<sup>+</sup>, Pb<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> 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 CaCl<sub>2</sub>), что является распространенным явлением среди ЦГТаз [26]. Катионы Mg<sup>2+</sup>, 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 ЦГТазами из *Geobacillus stearothermophilus* ET1 и *G. thermoglucosidans* СНВ1, 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 ЦГТазы, продуцируемой новым термоалкалотолерантным штаммом вида *C. mannaniyticus* 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 ЦГТазы 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 ЦГТазы. Достижимый уровень ферментативной конверсии картофельного крахмала в ЦД – 42% с преимущественным образованием  $\alpha$ - и  $\beta$ -ЦД (38.8 и 52.6 мас. %, соответственно) и незначительным количеством  $\gamma$ -ЦД (8.6 мас. %) после 24 ч инкубации дает основания рассматривать ЦГТазу *C. mannaniyticus* IB-OR17-B1 в качестве перспективного кандидата для разработки технологии получения ЦД. Несомненно, термостабильность и алкалотолерантность исследованного фермента позволила также внести штамм *C. mannaniyticus* IB-OR17-B1 в список потенциальных доноров гена ЦГТазы 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/amyase-2021-0003>
3. *Kurkov S.V., Lofisson 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. *Czinkoczky 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., Heaply 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., Bojadjieva 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 – Stärke. 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<sup>a</sup>, E. A. Gilvanova<sup>a</sup>, and G. E. Aktuganov<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> 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<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> 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