

На правах рукописи



ФЕДОРОВА ПОЛИНА ЮРЬЕВНА

**БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ
ПОЛИФРАКЦИОННОГО СОСТАВА
НА ОСНОВЕ ПРОДУЦЕНТА *RAENIBACILLUS EHIMENSIS* IB-739**

**03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)**

**АВТОРЕФЕРАТ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Уфа – 2012

Работа выполнена в лаборатории прикладной микробиологии Учреждения Российской академии наук Института биологии Уфимского научного центра РАН (ИБ УНЦ РАН)

Научные руководители: кандидат биологических наук, доцент

Усанов Николай Глебович

доктор биологических наук, профессор
Мелентьев Александр Иванович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Логинов Олег Николаевич

доктор химических наук, профессор
Варламов Валерий Петрович

Ведущая организация: Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский
институт пищевой биотехнологии Россий-
ской академии сельскохозяйственных наук
(г. Москва)

Защита диссертации состоится **17 февраля 2012 года в 14.00 часов** на заседании Объединенного диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г. Уфа, проспект Октября, д. 69. Тел. (347) 235-62-47 E-mail: ib@anrb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института биологии Уфимского научного центра РАН, на официальном сайте <http://ib.anrb.ru/sovet.html> и на сайте ВАК Минобрнауки РФ.

Автореферат разослан 12 января 2012 г.

Ученый секретарь Объединенного
диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



Р.В.Уразгильдин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Циклодекстрины (ЦД, циклические альфа-D-глюкопиранозиды), – перспективные биотехнологические продукты с высокой добавленной стоимостью, в основе технологии получения которых лежит энзиматическая трансформация крахмала микробным ферментом циклодекстринглюканотрансферазой (ЦГТазой, К.Ф.2.4.1.19).

Наиболее распространены и изучены альфа-, бета- и гамма-ЦД, различающиеся по количеству единиц α -D-глюкопиранозы в макрокольце, и соответственно, физическими и химическими свойствами.

Благодаря способности ЦД образовывать комплексы включения с разнообразными органическими и неорганическими соединениями, применение ЦД распространяется на такие непохожие отрасли, как пищевая промышленность, фармакология и косметика, органический синтез и нефтедобыча, сельское хозяйство и процессы защиты окружающей среды, биотехнологии и экологии (Singh et al., 2002; Biewer et al., 2002; Martin Del Valle, 2004; Szejtli, 2004; Li et al., 2007). Это обусловлено тем, что комплексообразование существенно изменяет физико-химические характеристики включенных молекул, придавая им новые, ранее не известные, полезные свойства.

В большинстве случаев для получения комплексов включения индивидуальных веществ с ЦД используют соответственно индивидуальные альфа-, бета- или гамма-ЦД. Однако, зачастую, например, для нужд пищевой, фармацевтической промышленности, требуется получить комплексы ЦД с веществами, состав которых не является гомогенным. Это могут быть вытяжки или экстракты растений, ароматические вещества природного происхождения и др. В этом случае использование индивидуальных ЦД не обеспечивает полностью включения всех компонентов системы и, тем самым, ограничивает потенциальные возможности получения инновационной продукции. В перечисленных случаях целесообразно использовать ЦД полифракционного состава, т.е. содержащие одновременно все три представителя гомологического ряда.

Для промышленного получения ЦД используются два принципиально разных подхода: метод неконтролируемой конверсии, в ходе которого в биохимический реактор вводятся лишь ЦГТаза и раствор крахмала, и контролируемый, когда в реакционную смесь добавляются еще и комплексообразователи (сольвенты) – органические или неорганические соединения, селективно реагирующие с одним из циклических сахаров с образованием нерастворимых или слаборастворимых комплексов включения, которые сдвигают равновесия реакции в сторону одного из целевых продуктов, в результате чего возрастает его выход (Abelyan, 2005). В ряде случаев выход ЦД возрастает, достигая 40-75% масс. по отношению к субстрату, но число подобных сольвентов, нашедших промышленное применение в производстве ЦД, ограничено.

Наиболее удачным вариантом технологии получения ЦД является сочетание специфичной ЦГТаза со специфичным комплексообразователем, который бы позволил осуществить конверсию крахмала с высоким выходом.

Применение комплексообразователей снимает проблему контаминации биореактора, упрощает технологию очистки продуктов конверсии из многокомпонентной реакционной смеси. В то же время, известные сольвентные технологии получения ЦД имеют ряд недостатков из-за токсичности комплексообразователей, сложности глубокой очистки ЦД от следовых количеств растворителей, их ограниченной доступности и высокой стоимости. В то же время существует потребность в дешевых технических ЦД, в которых допускается наличие органических растворителей. В связи с этим поиск новых эффективных технологичных малотоксичных сольвентов для организации многотоннажного производства альфа-, бета- и гамма-ЦД остается нерешенной и актуальной проблемой до настоящего времени.

Цель исследования

Разработать методы ферментативной трансформации крахмала в циклодекстрины с применением бактериальной циклодекстринглюканотрансферазы и специфического сольвента, обеспечивающих постоянство соотношения гомологов.

Задачи исследования

1. Провести тестирование коллекционных ЦГТ-активных культур для отбора штамма бактерий, секретирующего ЦГТазу широкой специфичности, катализирующую трансформацию крахмала в смесь трех гомологов ЦД.
2. Установить таксономическое положение штамма-продуцента и осуществить его идентификацию на основании совокупности морфологических, физиолого-биохимических и филогенетических характеристик.
3. Разработать способы выделения, очистки исследуемой ЦГТазы и изучить физико-химические и каталитические свойства фермента.
4. Определить оптимальные параметры ферментативной конверсии крахмала исследуемой ЦГТазой для получения ЦД с нативным соотношением гомологов в присутствии комплексообразователей.
5. Подобрать комплексообразователь и разработать технологию одновременного получения смеси альфа-, бета- и гамма-ЦД с высоким конверсионным выходом.

Научная новизна

Впервые обнаружен штамм вида *Paenibacillus ehimensis* IB-739, секретирующий ЦГТазу широкой специфичности, инициирующую превращение крахмала до смесей пригодных для одновременного синтеза трех ЦД.

Определена полная последовательность гена 16S рРНК *P. ehimensis* IB-739, проведена реконструкция модели филогенетического дерева и определено положение штамма в роду *Paenibacillus*.

Изучены физико-химические и каталитические свойства ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739. Максимальная каталитическая активность проявляется в интервале температур 40-45⁰С, оптимум рН=6,0, рН-стабильность в интервале 5,5–8,5, термостабильность – до 60⁰С. По данным электрофореза в присутствии SDS фермент имел молекулярную массу 75 кДа.

Исследованы различные комплексообразователи, в том числе используемые впервые, такие как бетулин, диметилсульфоксид, метил-трет-

бутиловый эфир, коллоидная сера, кристаллическая сера, механо-активированная сера; комбинация сольвентов: Сера-МЭК, для проведения конверсии крахмала в ЦД, которые могут быть применены в технологиях получения различных гомологов ЦД.

Разработана технология получения смеси ЦД полифракционного состава, основанная на использовании широкоспецифичной ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739 и нового бинарного сольвента (Сера-МЭК) в качестве комплексообразователя.

Практическая значимость

Штамм-продуцент, секретирующий ЦГТазу широкой специфичности, идентифицирован как *Paenibacillus ehimensis* IB-739.

Полная последовательность генов 16S рРНК культуры депонирована в базе данных EMBL (European Molecular Biology Laboratory)/GenBank и доступна в сети Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) под номером FN582329.

Подобраны условия подготовительной обработки крахмальных растворов высокой концентрации и определены оптимальные параметры ферментативной конверсии крахмала ЦГТазой *P. ehimensis* IB-739 для получения ЦД полифракционного состава: доза фермента 10,0 ед на 1,0 г субстрата; концентрация крахмала 5,0-15,0%, продолжительность процесса ферментализации – 8-12 ч.

Предложено новое техническое решение для осуществления ферментативной трансформации крахмала в ЦД полифракционного состава, основанное на использовании бинарной системы комплексообразователей.

Показана принципиальная возможность и перспективность использования изученных комплексообразователей в технологиях получения альфа-, бета- и гамма-ЦД.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на ряде научных форумов: международной научно-практической конференции «Современная биотехнология: фундаментальные проблемы, инновационные проекты и бионанотехнология» (Брянск, 2010), Международной научной конференции «Биотехнология начала III тысячелетия» (Саранск, 2010), VI Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2010), XIV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2011), XV Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2011); Всероссийской научной конференции с международным участием «ЭКОБИОТЕХ-2011» и II Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Современные методы и подходы в биологии и экологии» (Уфа, 2011); VI Всероссийской научной Интернет-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии» (Уфа, 2011).

Конкурсная поддержка работы

Исследования поддержаны грантом Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере «Разработка технологии получения опытных образцов альфа-, бета- и гамма-циклодекстринов» (Государственный контракт № 8370/13979 от 29.04.2011 г.) по программе «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» («У.М.Н.И.К.»).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 2 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикаций материалов кандидатских работ.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения результатов, выводов, приложений и списка цитируемой литературы, содержащего 194 ссылки. Работа изложена на 107 страницах машинописного текста, содержит 23 рисунка и 9 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы. В работе использовали штаммы продуцентов циклодекстринглюканотрансфераз из коллекции лаборатории прикладной микробиологии Института биологии УНЦ РАН: *Bacillus* sp. IB-739, *P. illinoisensis* IB-1087, *P. campinasensis* IB-417, *P. macerans* IB-1053, идентифицированные по физиолого-биохимическим и филогенетическим признакам.

Среды, используемые для наработки образцов ЦГТаза.

Среда для *Bacillus* sp. IB-739 включала следующие компоненты, г/л: крахмал – 10,0; пептон – 4,0; дрожжевой экстракт – 5,0; KH_2PO_4 – 1,0; CaCO_3 – 1,0; pH 7,0-7,2.

Среда для *P. illinoisensis* IB-1087 включала следующие компоненты, г/л: крахмал – 10,0; пептон – 5,0; дрожжевой экстракт – 5,0; K_2HPO_4 – 2,0; NaN_2PO_4 – 2,0; pH 7,2-7,4.

Среда для *P. macerans* IB-14 включала следующие компоненты, г/л: крахмал – 10,0; пептон – 3,0; дрожжевой экстракт – 3,0; кукурузный экстракт – 3,0; KH_2PO_4 – 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0; CaCO_3 – 1,0; pH 7,2-7,6.

Среда для *P. campinasensis* IB-417 включала следующие компоненты, г/л: крахмал – 10,0; пептон – 3,0; дрожжевой экстракт – 3,0; кукурузный экстракт – 3,0; K_2HPO_4 – 2,0; CaCO_3 – 2,0; Na_2CO_3 – 0,8-1,0; pH 9,2-9,8.

Условия культивирования. Выращивание бактерий осуществляли в течение 68-72 часов при температуре 37-39⁰С и скорости перемешивания 180 мин⁻¹ на воздушно-термостатируемых качалках типа УВМТ-12-250.

Таксономические исследования. Изучение морфологических и физиолого-биохимических характеристик используемых культур, способных к секреции внеклеточных ЦГТаз, проводили руководствуясь общей стратегией фенотипической дифференциации предложенной Gordon (1973) и описанной в руководствах: «Определитель бактерий Берджи» (1997), «Методы общей

бактериологии» (Герхардт и др., 1984), «Идентификация почвенных бактерий рода *Bacillus*» (Скворцова, 1983).

Культуральные особенности микроорганизмов изучали на агаризованных средах. Морфология клеток изучалась прямой микроскопией живых культур в динамике роста с использованием микроскопа «Leica DM 1000» (Германия).

Измерение ЦГТазной активности растворов и препаратов проводили модифицированным фенолфталеиновым методом (Усанов Н.Г. и др., 2007), используя для разбавления фермента 50 мМ ацетатный буфер pH 6,0-6,1, содержащий 10,0 мМ CaCl₂. За 1 единицу активности принимали количество ЦГТазы, катализирующее образование 1,0 мкМ β-ЦД в течение 1 мин при 40⁰С.

Измерение вязкости растворов крахмала проводили с помощью цифрового ротационного вискозиметра Brookfield LSRV (США) в стеклянном реакторе объемом 400 мл, снабженном термостатирующей рубашкой. Температуру в рубашке поддерживали с помощью водного циркуляционного ультратермостата типа УН-4. Температуру в стакане фиксировали с помощью цифрового термометра с выносным датчиком («RST Sweden», Швеция).

Ферментация. Реакцию ферментативной конверсии картофельного крахмала в ЦД проводили в периодическом режиме в стеклянном реакторе с рабочим объемом 160 мл, снабженном термостатирующей рубашкой и магнитным перемешивающим устройством. Реакцию проводили при температуре 45⁰С и скорости мешалки 300 мин⁻¹.

Количественное определение концентрации циклодекстринов. Определение продуктов трансформации крахмала под действием ЦГТазы осуществляли с помощью ВЭЖХ на колонке «SEPARON-NH₂»-5мкм (3x150 мм), используя в качестве элюента смесь ацетонитрил - вода в объемном соотношении 63:37. Подачу растворителя осуществляли насосом высокого давления НРР-5001 со скоростью 0,7 мл/мин и рабочим давлением – 70-100 ати, в качестве детектора использовали рефрактометр RIDK-102. Регистрацию и оцифровку аналогового сигнала, последующую обработку хроматограмм проводили с помощью программно-вычислительного комплекса «Мультихром 1.59».

Статистическая обработка экспериментальных данных. Статистическую обработку результатов экспериментов проводили стандартными методами дисперсионного и корреляционного анализа, выполнявшиеся с помощью программы Microcal Origin 7.5 Pro.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор продуцента ЦГТазы

Фактором селекции для отбора продуцентов ЦГТаз служила их специфичность в отношении спектра ЦД, накапливающихся в продуктах конверсии крахмала. При действии ЦГТазы на крахмал в реакционной смеси одновременно образуются все три гомолога. В зависимости от того, какой из них доминирует в продуктах конверсии, различают α-, β- и γ-ЦГТазы, природа которых в свою очередь зависит от видовых генетических особенностей

штамма-продуцента. Например, α - (Gawande and Patkar, 2001), β - (Alves-Prado et al., 2007) и γ -ЦГТазы (Kato and Horikoshi, 1986; Hirano et al., 2006).

Для изучения кинетических особенностей ЦГТаз бактерий коллекции Института биологии УНЦ РАН *P. campinasensis* IB-417, *P. illinoisensis* IB-1087, *P. macerans* IB-I4 и *Bacillus* sp. IB-739 был применен собственный подход, основанный на определении безразмерных коэффициентов (Федорова, Усанов, 2011), являющихся отношениями молярных концентраций $KU_{\alpha}=[\beta\text{-ЦД}]/[\alpha\text{-ЦД}]$ и $KU_{\gamma}=[\beta\text{-ЦД}]/[\gamma\text{-ЦД}]$ в продуктах суточной конверсии крахмала. На рисунке 1 представлены результаты сравнения каталитических свойств четырех изученных штаммов циклодекстриногенных бактерий. Как следует из графического представления, зависимости молярных соотношений $KU_{\alpha}=[\beta\text{-ЦД}]/[\alpha\text{-ЦД}]$ и $KU_{\gamma}=[\beta\text{-ЦД}]/[\gamma\text{-ЦД}]$ от величины стартового соотношения фермент/субстрат (E/S) в двойных логарифмических координатах выражаются линейными функциями. Полученная информация позволяет сравнивать динамику накопления различных форм ЦД, а также ее зависимость от дозы внесенного фермента для разных типов ЦГТаз. Например, при использовании β -ЦГТазы алкалотолерантной *P. campinasensis* (А), накопление β -ЦД относительно α -ЦД падает с увеличением относительной дозировки фермента и этот процесс сопровождается ростом отношения KU_{α} . Учитывая, что фермент на ранних стадиях реакции (что адекватно низким удельным дозировкам ЦГТаз) катализируют преимущественное образование длинноцепочечных β - и γ -ЦД, которые по мере накопления начинают изомеризоваться в α -ЦД, следует, что удельный выход γ -ЦД также снижается по мере продолжения реакции. Схожими кинетическими особенностями обладает β -ЦГТаза *P. illinoisensis* (Г).

ЦГТаза *P. macerans* (В) катализирует трансформацию крахмала иным образом: сначала в среде накапливается α -ЦД, который по мере увеличения соотношения E/S трансформируется в β -ЦД. Каталитическая «ретрансформация» α - и γ -ЦД в β - форму, по мере нарастания их концентраций в ходе реакции является типичной и хорошо известной особенностью ферментов данного типа (Patrick et al., 1995).

Для ЦГТазы *Bacillus* sp. IB-739 характерно образование относительно постоянных соотношений α -, β - и γ -ЦД, мало зависящих от дозы внесенной ЦГТазы (Б), с достаточно стабильными коэффициентами KU_{α} и KU_{γ} при различных соотношениях E/S. Бактерии *Bacillus* sp. IB-739 секретируют ЦГТазу широкой специфичности, инициирующую превращение крахмала до смесей, пригодных для одновременного синтеза трех циклических декстринов.

Морфологическая и физиолого-биохимическая характеристика продуцента ЦГТазы

Культура аэробных спорообразующих бактерий *Bacillus* sp. IB-739 была выделена в 1987 году из серой среднегумусной почвы Республики Башкортостан на селективной среде, содержавшей 0,5% β -ЦД в качестве единственного источника углерода и энергии (Усанов и др., 1989). Штамм *Bacillus* sp. IB-739 обладал выраженной ЦГТазной активностью, а по каталитическим

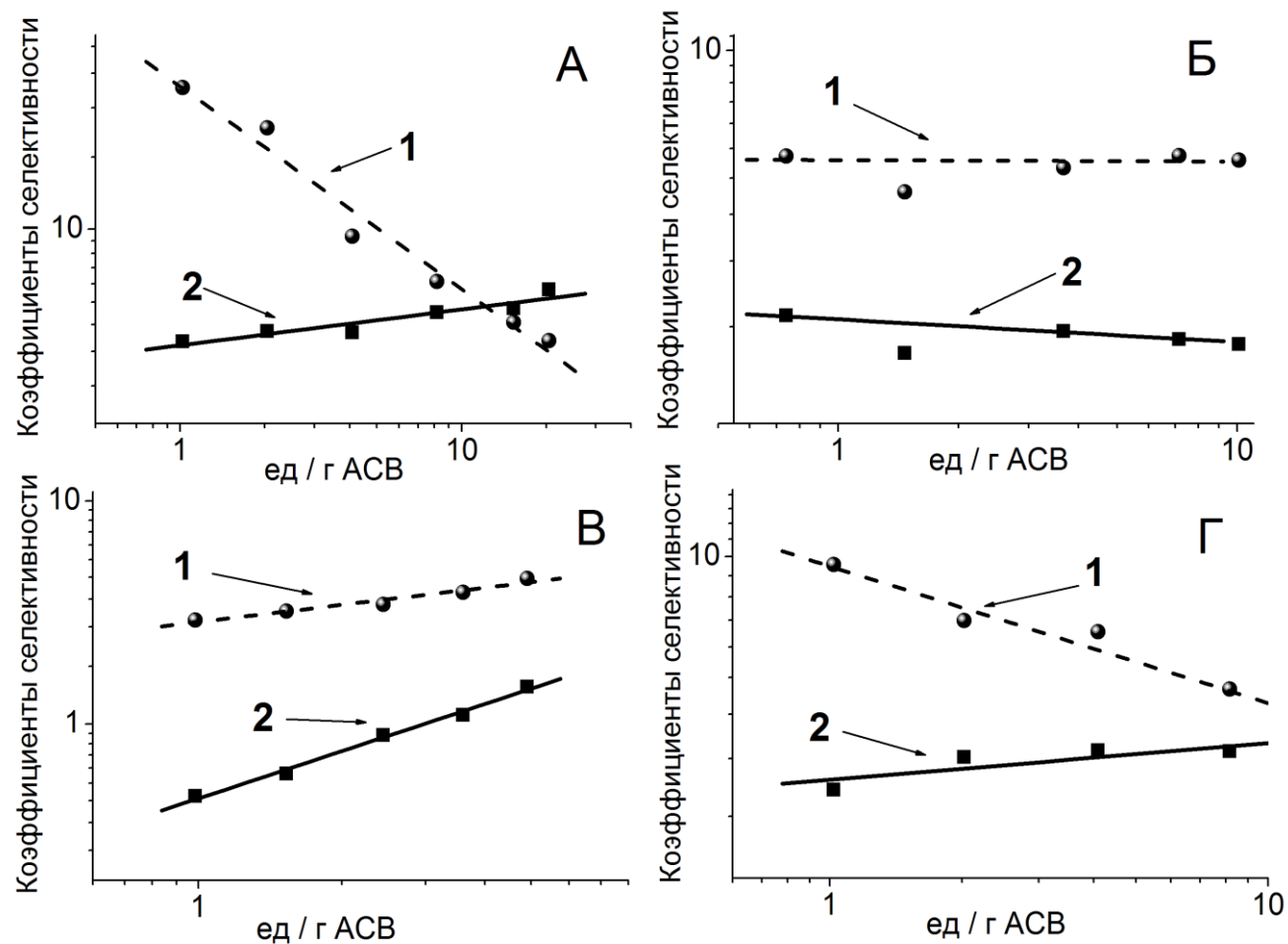


Рисунок 1. Зависимость выхода циклодекстринов от концентрации ЦД Газ, выделенных из бактерий различных видов в течение 24 ч трансформации 2,75% крахмала: А – *P. campinasensis* IB-417; Б – *Bacillus* sp. IB-739; В – *P. macerans* IB-I4; Г – *P. illinoisensis* IB-1087. Кривые (1) и (2) обозначают величины безразмерных коэффициентов равных мольным отношениям $[\beta\text{-ЦД}]/[\alpha\text{-ЦД}]$ и $[\beta\text{-ЦД}]/[\gamma\text{-ЦД}]$ в продуктах реакции соответственно.

своим свойствам фермент, резко отличался от аналогичного фермента *P. macerans* ВКМ В-506^T (Егоров и др., 1988). Согласно физиолого-биохимическому тестированию культура *Bacillus* sp. IB-739 была отнесена к фирмикутам, обладающим подвижностью, образующим эллиптические споры, раздувающие спорангии, и способным к росту при температурах до 50⁰С. Рост бактерий наблюдается в диапазоне рН 6,4-8,7 на средах с глюкозой, крахмалом, пептоном, дрожжевым экстрактом. Клетки обладают каталазной и оксидазной активностью, восстанавливают нитраты, не образуют ацетилметилкарбинол. На жидких средах с α -ЦД, β -ЦД, глюкозой, сахарозой, арабинозой, маннитом, глицерином и D-ксилозой развитие бактерий сопровождается подкислением без образования газа.

Филогенетическая характеристика продуцента ЦГТазы

Согласно сумме фенотипических признаков, исследуемый штамм IB-739 был таксономически позиционирован как близкий к типовой культуре *Paenibacillus ehimensis* JCM 9907^T (Kuroshima et al., 1996; Lee et al., 2004). По данным анализа последовательностей гена 16S рРНК построено филогенетическое древо. Филогенетические взаимоотношения исследуемого штамма с другими видами *Paenibacillus*, в том числе обладающими ЦГТазной активностью, представлены на рисунке 2.

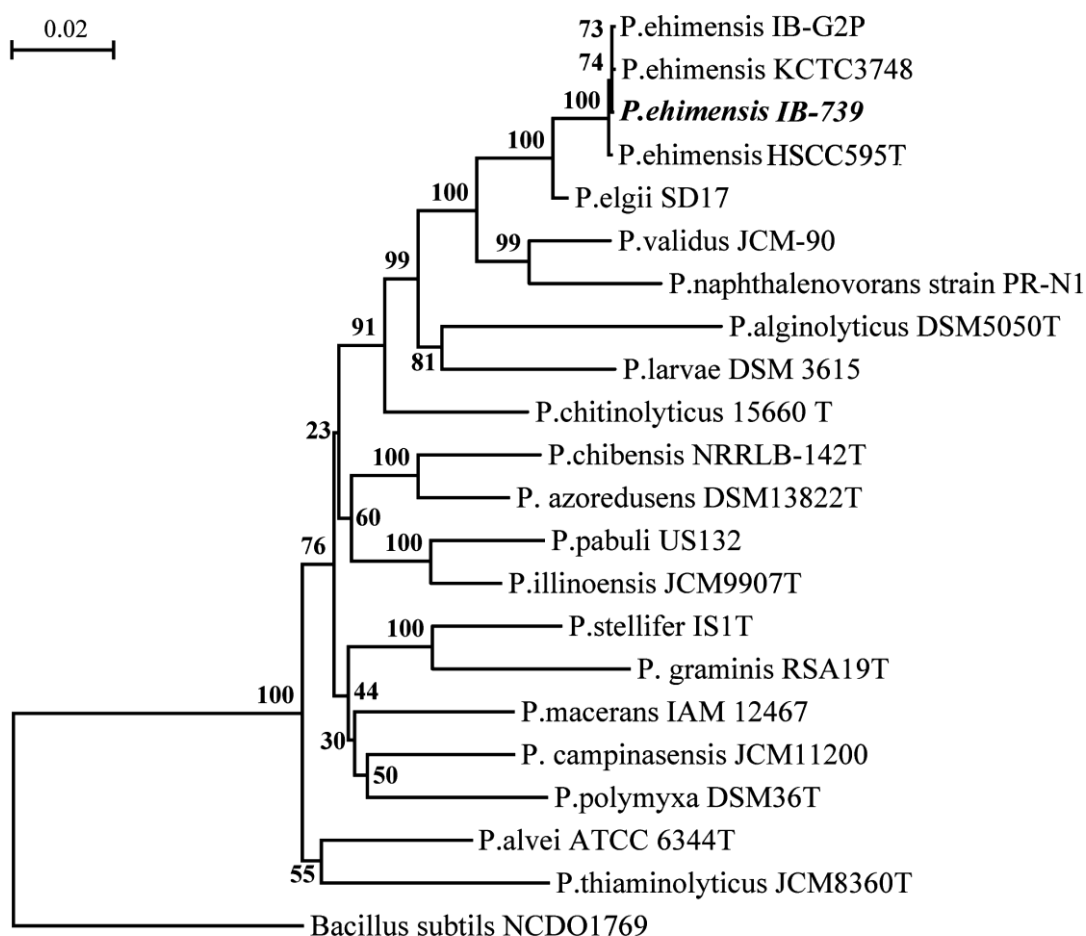


Рисунок 2. Филогенетическое древо, демонстрирующее возможное положение штамма *P. ehimensis* IB-739 среди представителей рода *Paenibacillus*.

Обнаружено, что ближайшими родственными культурами изолята IB-739 оказались *P. ehimensis* KCTC 3748^T (AY116665), *P. ehimensis* IB-G2P (FN582330), *P. ehimensis* HSCC 595 (AB045101), *P. elgii* SD17 (AY090110) с гомологией генов 16S рНК 98,7%; 99,4%; 99,1% и 97,6% соответственно. Как видно из представленного древа, культура IB-739 вписывается в кластер *P. ehimensis*, на основании чего с высокой долей вероятности может быть отнесена к представителям этого вида.

Штамм депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под названием *P. ehimensis* ВКМ В-2680D.

Оптимизация состава питательной среды для культивирования продуцента ЦГТаза *P. ehimensis* IB-739

Известно, что большинство ЦГТаз экстрацеллюлярны. Однако, в случае культивирования *P. ehimensis* IB-739, процесс выделения ЦГТаза из КЖ осложнялся накоплением в ферментационной среде больших количеств микробных экзополисахаридов, обуславливающих повышенную вязкость КЖ. Для снижения накопления экстрацеллюлярных полисахаридов в КЖ, а также для устойчивого биосинтеза и увеличения активности ЦГТаза культурой *P. ehimensis* IB-739, была проведена оптимизация состава питательной среды, включающая варьирование таких параметров как содержание субстрата, источников азота различной природы, буферных компонентов, источников кальция. Эффект был достигнут при выращивании штамма в присутствии карбоната кальция в концентрации 1-2 г/л. Динамическая вязкость КЖ составила 55-75 сПа, в то время, как в варианте без использования карбоната кальция она достигала 1560-1640 сПа, и была приемлема для выделения ЦГТаза.

Изучение динамики синтеза ЦГТаза *P. ehimensis* IB-739

Изучение динамики синтеза ЦГТаза культурой *P. ehimensis* IB-739 показало, что секреция ЦГТаза начиналась через 25-27 ч от начала культивирования с подъемом активности до максимального (и стабильного) уровня 3,7-4,2 ед/мл после 48-55 ч. Микроскопирование проб КЖ показало, что процесс активного деления клеток к этому времени прекращается. Спорообразование культуры *P. ehimensis* IB-739 в ферментационной среде начиналось через 48 ч культивирования. Этот процесс полностью завершался через 72 ч, когда в среде накапливалось максимальное количество ЦГТаза.

Обнаружено, что максимальное накопление ЦГТаза в жидкой среде штаммом *P. ehimensis* IB-739

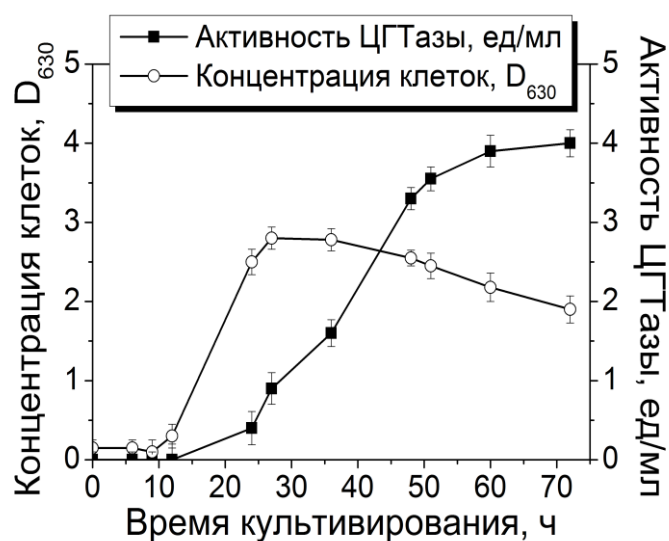


Рисунок 3. Динамика роста биомассы и синтеза ЦГТаза в ходе культивирования штамма *P. ehimensis* IB-739.

происходит в период стационарной фазы роста и коррелирует с процессом перехода от вегетативной стадии роста к спорообразованию.

Очистка препарата ЦГТаза *P. ehimensis* IB-739

В результате проведенной очистки конечный выход ЦГТаза составил ~12% от начального, при удельной активности препарата ~770 ед/мг белка и степени очистки 25,9%. Общие результаты очистки ЦГТаза *P. ehimensis* IB-739 представлены в таблице 1.

Таблица 1. Очистка ЦГТаза культуры *P. ehimensis* IB-739

Стадии очистки	Объем, мл	ЦГТаза		Белок, мг	Степень очистки	Выход, %
		Ед.	Ед/мг белка			
Исходная культуральная жидкость	1200	2028	29,2	68,4	1	100
Ультрафильтрация	300	1926	52,3	36,8	1,76	94,9
Сорбция на крахмале	105	803,2	181,3	4,43	6,11	39,6
Ионно-обменная хроматография	22	245,1	769,2	0,29	25,9	12,08

Методом электрофореза в денатурирующих условиях была продемонстрирована гомогенность полученной ЦГТаза, достаточная для изучения ее физико-химических и каталитических свойств (рис. 4).

По зависимости электрофоретической подвижности от молекулярной массы белковых молекул была определена молекулярная масса ЦГТаза культуры *P. ehimensis* IB-739 равная 75 кДа.

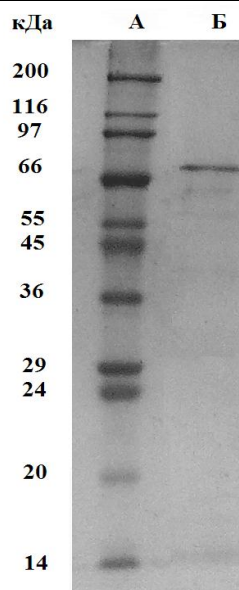


Рисунок 4. Электрофореграмма препарата ЦГТаза в 12%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. А – маркеры М.М.; Б – препарат ЦГТаза, после частичной очистки.

Физико-химические свойства ЦГТаза *P. ehimensis* IB-739

Стандартными методами были определены температурный и pH оптимумы, температурная и pH стабильность очищенного препарата (рис. 5). Исследуемый фермент проявлял наибольшую циклизующую активность при $T=40-45^{\circ}\text{C}$, величина которой существенно зависела от кислотности растворов с оптимумом $\text{pH}=6,0$, препарат был относительно устойчив в диапазоне pH 5,5-8,5, при температурах до 60°C . Добавление ионов кальция в виде CaCl_2 (в конечной концентрации 10 мМ) оказывало лишь незначительное стабилизирующее действие на изучаемый фермент.

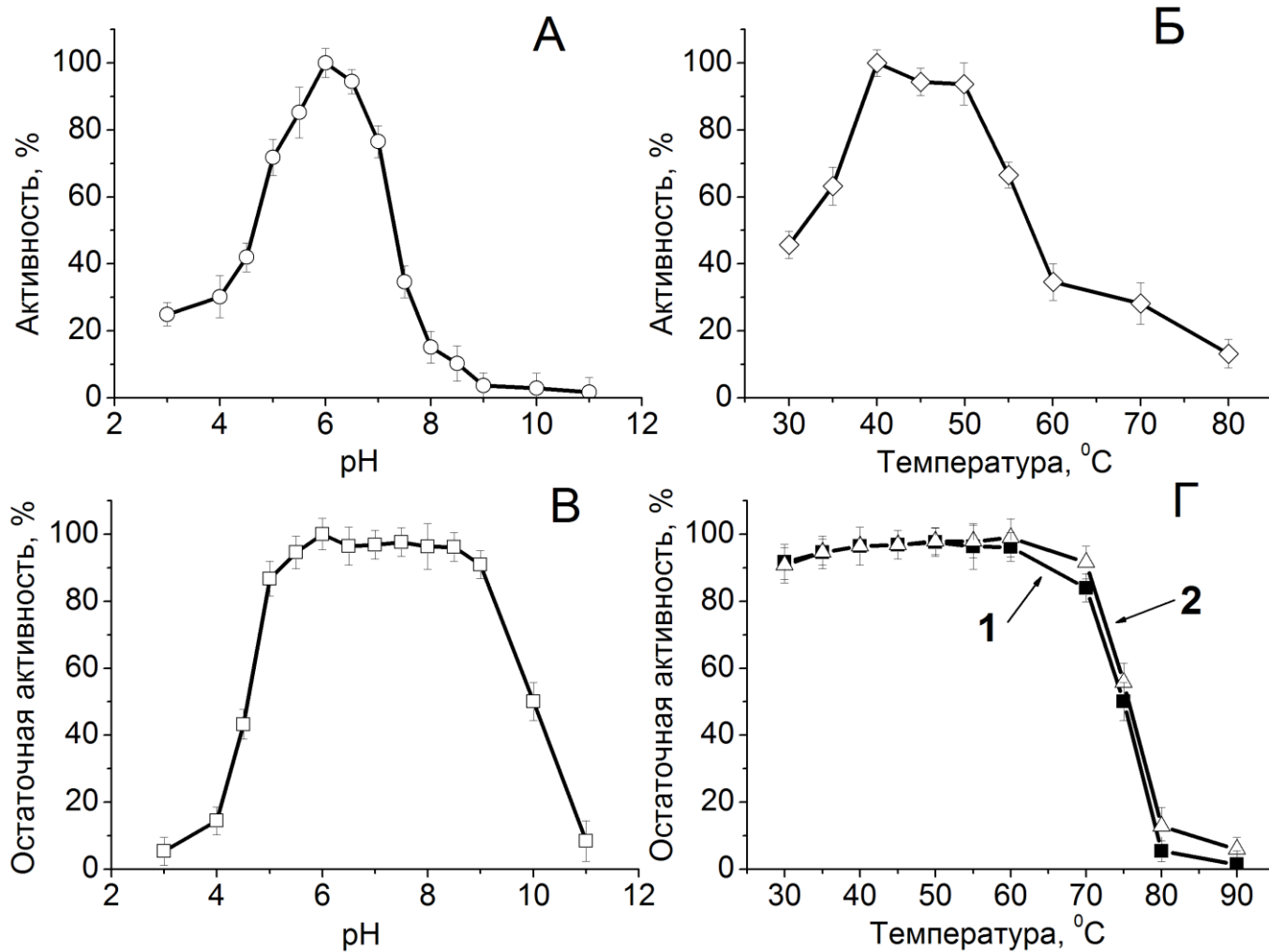


Рисунок 5. Физико-химические свойства ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739: А – pH-оптимум, Б – оптимальная температура реакции образования циклодекстринов, В – pH-стабильность, Г – термостабильность (1 – без добавления Ca^{2+} и 2 – в присутствии 10 мМ CaCl_2).

Исходя из того, что ЦГТазы обладают аффинностью к субстрату, мы предположили, что наличие крахмала может оказывать стабилизирующее влияние на термостабильность. В связи с этим, в нашей работе был использован метод определения термостабильности ЦГТазы в присутствии субстрата по динамике изменения динамической вязкости среды с помощью цифрового ротационного вискозиметра Brookfield LSRV при скорости вращения ротора 10 мин^{-1} .

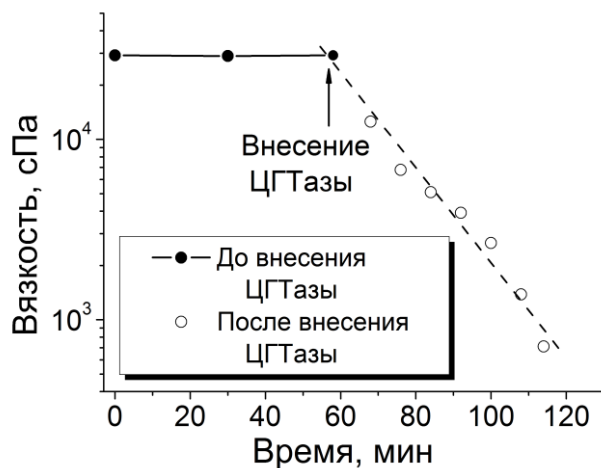


Рисунок 6. Снижение вязкости 10%-ного раствора крахмала в присутствии ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739.

Снижение вязкости 10%-ного раствора крахмала при 70°C после внесения фермента происходило в течение 56 мин (рис. 6). Из этого следует, что при 70°C фермент активно работает и присутствие субстрата (крахмала) оказывает стабилизирующее действие на фермент. Этот факт говорит о возможности проведения реакции трансформации крахмала в ЦД при более высокой, чем оптимальная, температуре, оказывая положительное влияние на реологические свойства ферментационной среды, без существенного снижения циклизующей активности

ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739. В технологическом плане это указывает на принципиальную возможность применения данного фермента для предварительного «оживления» крахмального клейстера перед ферментативной трансформацией.

Ферментативная трансформация крахмала в циклодекстрины

В процессе конверсии крахмала происходит одновременное образование всех трех ЦД в различных соотношениях α -, β - и γ -ЦД. Выход индивидуальных ЦД зависит от характера используемой ЦГТазы, ее количества, концентрации субстрата, физико-химических условий проведения ферментного катализа.

Влияние дозировки фермента на накопление ЦД

Определяющее значение для процесса ферментации имеет количество добавляемого фермента. Незначительный избыток фермента приводит к резкому снижению выхода ЦД, поскольку начинает преобладать реакция диспропорционирования с образованием линейных мальтоолигосахаридов. При низких концентрациях ЦГТазы количество образовавшихся ЦД также незначительное, что может быть объяснено тем, что за данный отрезок времени реакция не успевает полностью закончиться, т.е. при увеличении времени инкубации возможно достижение максимального выхода ЦД. Таким образом, для получения удовлетворительного выхода ЦД количество добавляемого фермента необходимо по возможности минимизировать (Абелян и др., 1991).

Особенностью ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739 является то, что для этого фермента характерно образование относительно постоянных соотношений α -, β - и γ -ЦД, мало зависящих от дозы внесенной ЦГТазы. Однако суммарный выход ЦД может зависеть от внесенной дозы фермента. Данные наших исследований свидетельствуют (рис. 7), что оптимальными для трансформации крахмала в ЦД можно считать удельную дозировку на уровне 8,0-10,0 ед на 1 г субстрата.

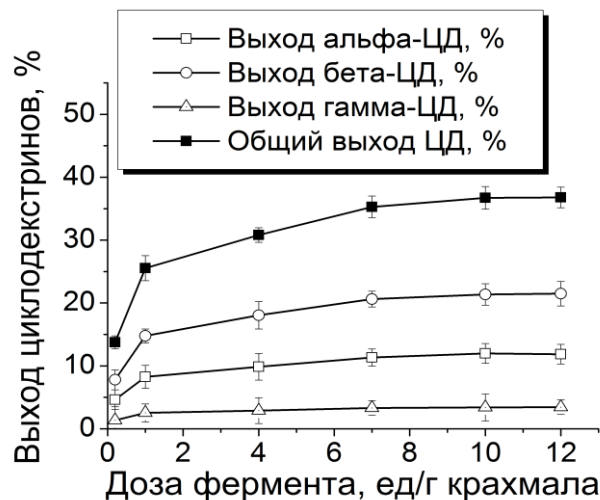


Рисунок 7. Влияние дозировки ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739 на выход циклодекстринов.

Влияние времени трансформации на выход ЦД

Концентрация ЦД во время конверсии крахмала непрерывно меняется, и содержание циклических олигосахаридов в реакционной смеси практически всегда проходит через максимум. При действии исследуемой ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739 на неочищенный 3%-ный картофельный крахмал при удельной дозировке фермента 10,0 ед/г, происходило одновременное накопление α -, β - и γ -ЦД, при этом реакция практически прекращалась через 10-12 часов. Суммарный выход циклических декстринов достигал 45-47% от использованного субстрата (рис. 8).

Известно, что циклические продукты, образовавшиеся в первый момент реакции, продолжают участвовать в ней, непрерывно трансформируясь друг в друга, причем этот процесс может происходить и в отсутствие крахмала (Vilett et al., 1990; Sabioni and Park, 1992; Bovetto, 1992; Абелян, 1995).

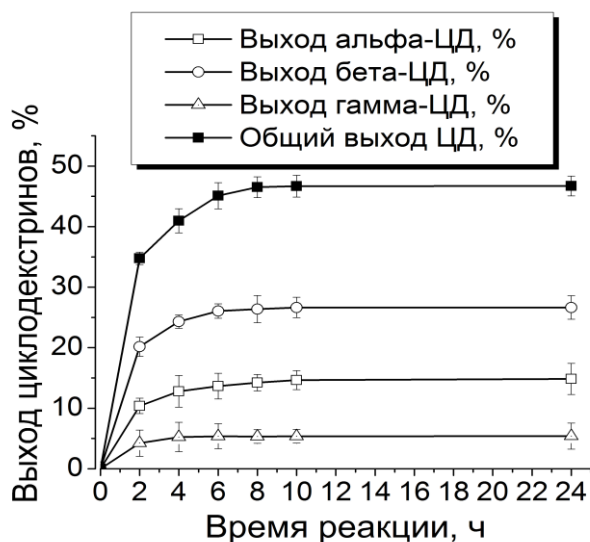


Рисунок 8. Влияние времени реакции на выход циклодекстринов. Концентрация ЦГТазы 10,0 ед на 1 г субстрата.

Для ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739 помимо трансформации крахмала в ЦД свойственны также реакции дециклизации и межмолекулярного трансгликозилирования. При конверсии смеси, содержащей 5%-ный раствор β -ЦД в 50 мМ ацетатном буфере (рН 6,0-6,1) и ЦГТазу *P. ehimensis* IB-739 (в дозировке 10,0 ед/г β -ЦД), в продуктах реакции обнаруживаются три гомолога ЦД при соотношении α -, β -, γ -форм равном 12,5: 83,6: 3,9 % масс.

Влияние концентрации субстрата на выход ЦД

Концентрация субстрата существенно влияет на выход ЦД в результате реакции циклизации. В процессе изменения стартовых концентраций неочищенного субстрата в диапазоне от 1

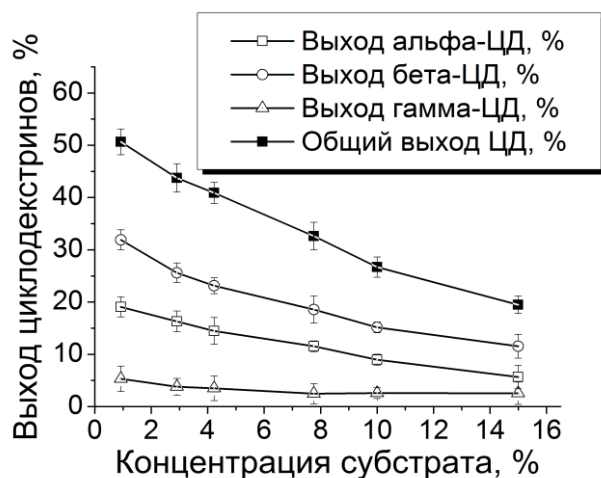


Рисунок 9. Влияние концентрации субстрата на выход циклодекстринов. Концентрация ЦГТазы 10,0 ед на 1 г субстрата.

до 15%, удельный выход суммы циклических продуктов снижался соответственно с 55% до 20% (рис. 9). Аналогичные результаты получены также для других типов ЦГТаз (Makela et al., 1988; Akimaru et al., 1991a; Bovetto et al., 1992; Abelyan et al., 1993; Абелян и др., 1994).

Выход ЦД выше при использовании неразжиженного (нативного) крахмала (Lee and Kim, 1991). Однако, в этом случае, достижимое содержание субстрата в биореакторе не может превышать 3-5%, из-за высокой вязкости клейстера. Снижение концентраций приводит к одновременному увеличению объемов реакторов и повышению финансовых затрат. Возрастают энергетические расходы на выпаривание больших количеств жидкости в процессе последующего выделения ЦД из реакционной смеси, снижаются экономические показатели. Использование высоких концентраций крахмала предполагает его предварительную обработку химическими, физическими или ферментными методами (Абелян и др., 1995a).

Наиболее распространенными являются ферментные методы обработки, например, крахмал гидролизующими ферментами, такими как пуллуланызы и изоамилазы, увеличивающими выход ЦД на 4-6% (Schmid, 1996; Rendleman, 1997). В то же время, для ожижения крахмала применяются ЦГТазы, используемые для трансформации крахмала (Lee and Kim, 1992; Slominska and Sobkowiak, 1997; Prowe and Antranikian, 2001).

Для изучения процессов ферментативной трансформации крахмала в ЦД, при дальнейших исследованиях, мы проводили предварительное ожижение субстрата, используя ферментативную обработку суспензий крахмала ЦГТазой *P. ehimensis* IB-739. При этом дозировка фермента 0,2 ед/г крахмала

снизения вязкости 10 и 15%-ных растворов крахмала в присутствии ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739.

Для изучения процессов ферментативной трансформации крахмала в ЦД, при дальнейших исследованиях, мы проводили предварительное ожижение субстрата, используя ферментативную обработку суспензий крахмала ЦГТазой *P. ehimensis* IB-739. При этом дозировка фермента 0,2 ед/г крахмала

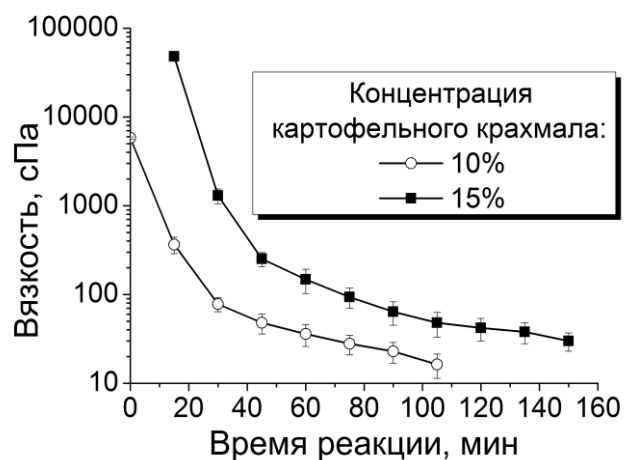


Рисунок 10. Снижение вязкости 10 и 15%-ных растворов крахмала в присутствии ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739.

обеспечивала снижение вязкости даже 15%-ного раствора картофельного крахмала до приемлемых значений 600-700 сПа. Процесс изменения вязкости 10 и 15%-ных растворов крахмала с течением времени показан на рисунке 10.

Ферментативная конверсия крахмала с использованием органических и неорганических соединений

Исходя из полученных данных, был сделан вывод о том, что, несмотря на все ранее обнаруженные положительные особенности ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739 суммарный выход ЦД не превышает 50% и достигнуть технологически приемлемой степени конверсии субстрата без использования комплексообразователей нам не удастся.

Известно, что селективность комплексообразователя сильно зависит от типа используемой ЦГТазы, что приводит к совершенно разным результатам, в одном случае повышая, в другом – подавляя реакцию циклизации (Blackwood and Bucke, 2000; Starnes, 2001). В то же время, выход и соотношение ЦД также меняются в зависимости от условий реакции, которые необходимо подобрать для каждого конкретного фермента.

В нашей работе, мы изучали влияние различных комплексообразователей на процесс ферментативной конверсии картофельного крахмала (5%-ного раствора, предварительно оживленного ЦГТазой *P. ehimensis* IB-739). Для этих целей в ферментационную среду добавляли исследуемое вещество в количестве, определяемом из стехиометрического соотношения комплексант: ЦД = 1:1, предполагая, что выход ЦД, составит не менее 50% от количества субстрата.

Результаты испытания ряда сольвентов в процессе ферментализа и их влияния на суммарный выход ЦД, а также выход их индивидуальных форм представлены на рисунке 11. По этим данным, в контрольном варианте опыта, при суммарном выходе ЦД 61,3%, соотношение α -, β - и γ -ЦД составило 28,0: 59,6: 12,4 % масс., что можно рассматривать в качестве равновесного состава продуктов реакции для данной ЦГТазы.

Большинство испытанных комплексообразователей существенно увеличивают суммарный выход ЦД: избирательно повышают выход β -ЦД, но приводят к снижению доли α - и γ -ЦД в конечном продукте.

При использовании элементной серы общий выход ЦД увеличивался незначительно – на 8-10%. Следует отметить, что при этом, соотношение α -: β -: γ -ЦД практически не изменялось по сравнению с результатами конверсии крахмала без добавления комплексообразователей и составило 28,1: 59,0: 12,9 % масс., что соответствует равновесному состоянию при выходе 67,8%.

Известно, что ЦД плохо подходят для получения комплексов с неорганическими соединениями (Szejtli, 1988). В отношении серы известно, что она образует комплекс включения с γ -ЦД, в котором она представлена в аллотропной форме S_8 (Патент РФ № 2321598, 2008). Получение комплексов включения ЦД с серой затрудняется ее чрезвычайно низкой растворимостью в водных средах. Возможно, невысокий выход ЦД при добавлении

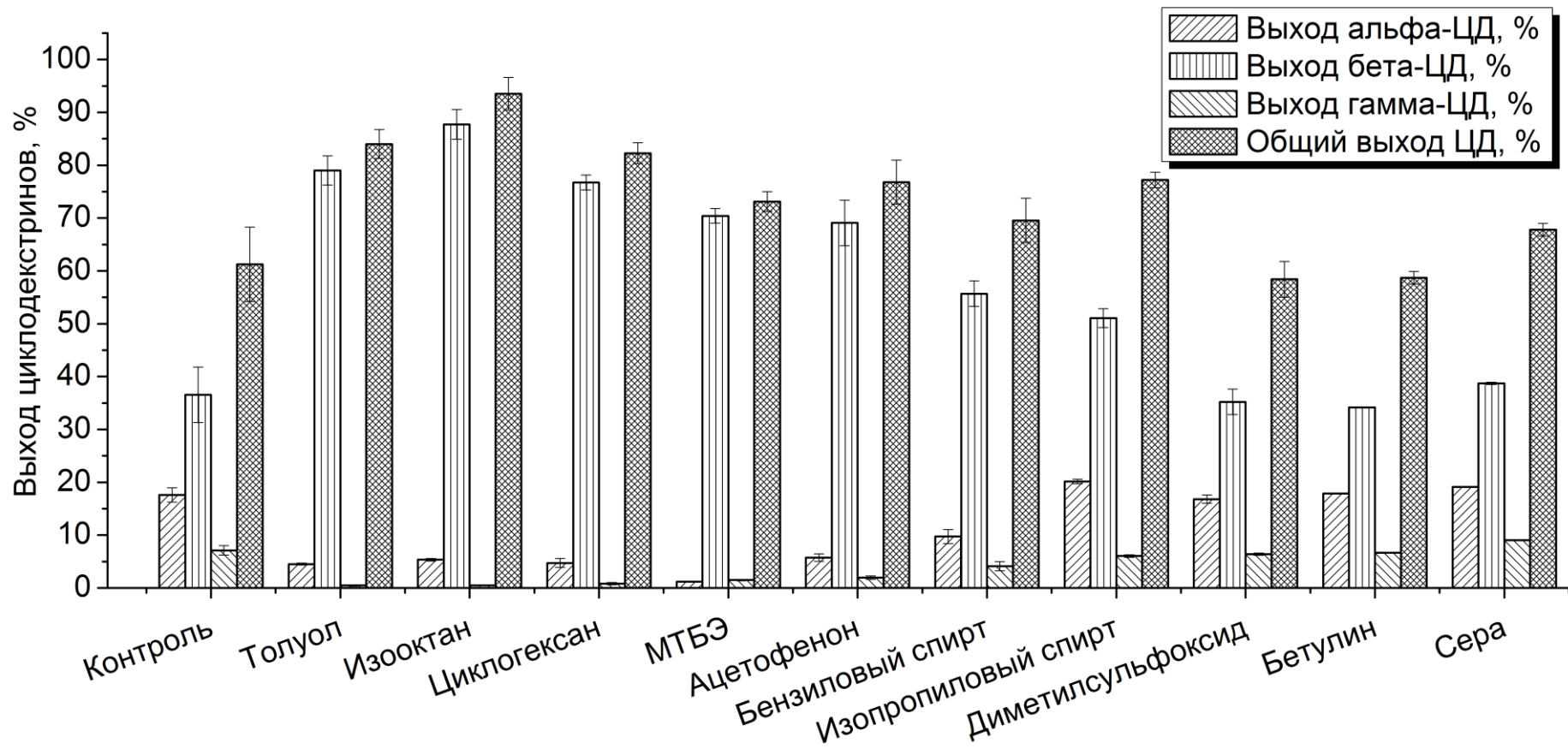


Рисунок 11. Состав продуктов ферментативной конверсии крахмала при использовании различных комплексообразователей. В качестве субстрата использовали 5%-ный картофельный крахмал. Дозировка ЦГТази 10,0 ед на 1,0 г субстрата.

комплексообразователя может быть связан с недостаточной доступностью элементарной серы для комплексообразования с ЦД в реакционных растворах.

С целью преодоления этой проблемы мы решили использовать различные формы серы, а именно коллоидную, полученную из гипосульфита натрия (Методические разработки..., 1999), и механо-активированную, полученную при ее механической обработке в дезинтеграторном устройстве. В другом варианте мы решили использовать раствор серы. Эмпирически был подобран растворитель для элементарной серы – метилэтилкетон (МЭК), согласно предварительным испытаниям, не сдвигающий равновесие в сторону образования α - или β -ЦД. Предварительно была определена растворимость серы в МЭК, составившая $5,24 \pm 0,2$ мг/мл.

В серии экспериментов была осуществлена ферментативная трансформация 10%-ного деполимеризованного картофельного крахмала ЦГТазой *P. ehimensis* IB-739 (в дозировке 10 ед/г) в присутствии серы и ее раствора в МЭК (при стехиометрическом соотношении комплексант : ЦД = 1:1). В таблице 2 представлены полученные результаты.

Таблица 2. Состав продуктов ферментативной конверсии 10%-ного «оживленного» картофельного крахмала при использовании различных форм серы в качестве комплексообразователей

Сольвент	Общий выход ЦД, %	Соотношение ЦД в реакционной смеси, % масс.		
		альфа-	бета-	гамма-
Без сольвента	36,07	30,9	57,1	12,1
Сера механо-активированная	44,22	27,6	69,3	3,1
Сера коллоидная	50,85	32,1	63,4	4,5
Сера в МЭК	65,01	29,0	65,8	5,2

Из представленных данных следует, что в варианте с сочетанием двух комплексообразователей (Сера+МЭК), степень конверсии 10%-ного картофельного крахмала повышается до 65-67%. Без использования комплексообразователей суммарный выход ЦД не превысил 36%. Существенного изменения соотношения α -, β -, γ -ЦД по сравнению с контролем не происходит и, таким образом, данная смесь комплексообразователей позволяет осуществить конверсию крахмала с более высоким выходом одновременно трех гомологов.

Разработка лабораторной технологии получения ЦД полифракционного состава

С применением сочетания широкоспецифичной ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739 и бинарного комплексообразователя была разработана лабораторная технология получения ЦД полифракционного состава, включающая следующие основные этапы (рис. 12):

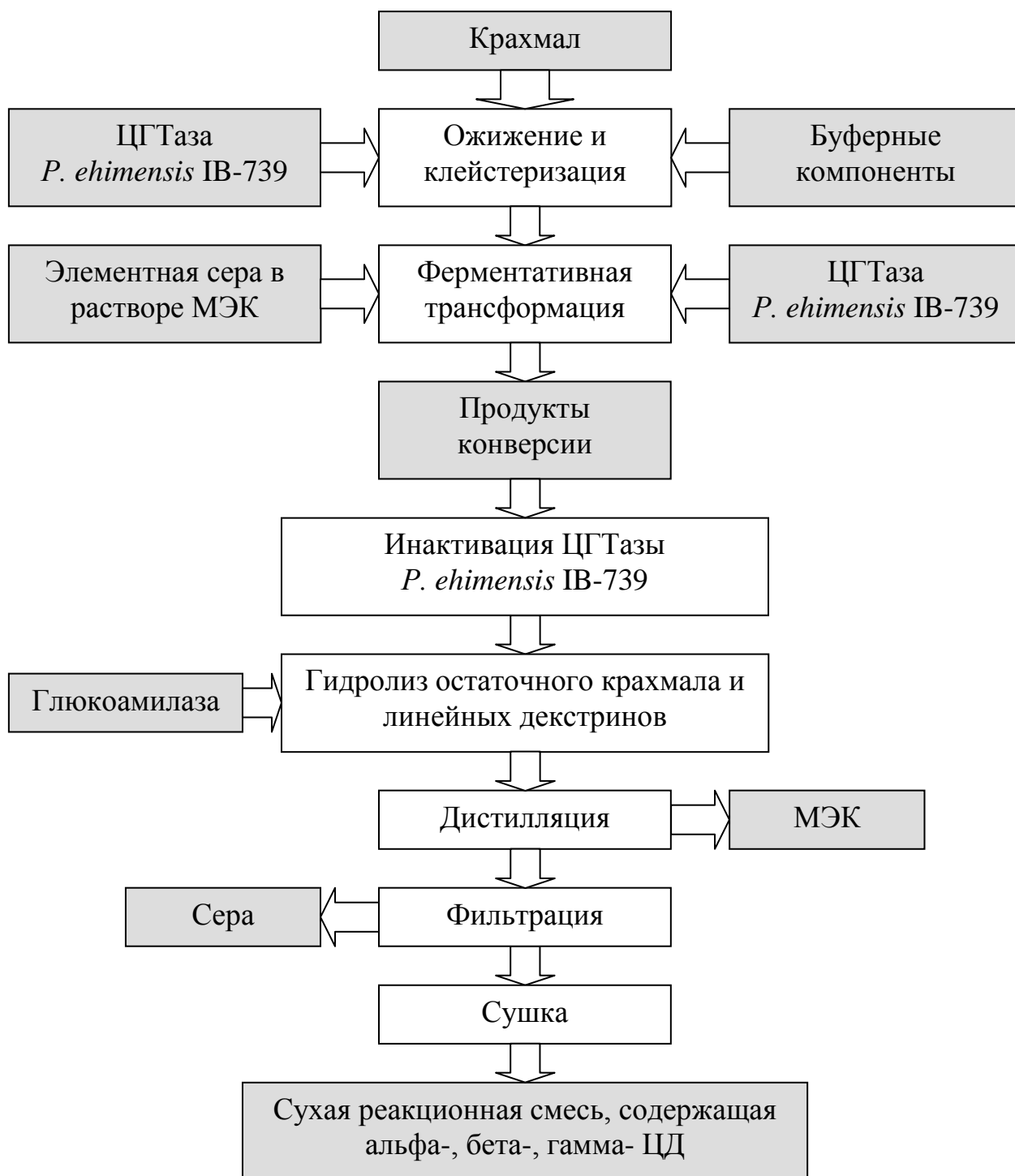


Рисунок 12. Схема получения смеси циклодекстринов.

1. Подготовка субстрата для ферментативной конверсии.

В качестве субстрата был использован 15%-ный картофельный крахмал. Оптимальная дозировка ЦГТаза *P. ehimensis* IB-739 для ожижения по предварительным экспериментам составила 0,2 ед на 1,0 г АСВ крахмала.

2. Ферментативная конверсия в присутствии бинарного комплексообразователя.

Дозировка ЦГТаза *P. ehimensis* IB-739 для реакции циклизации составила 10,0 ед на 1,0 г крахмала.

Предварительно были подобраны оптимальная концентрация МЭК (5% об/об) и элементной серы (5%) в растворе МЭК для получения наибольшего выхода ЦД без существенного изменения соотношения между α -, β -, γ -ЦД.

Основываясь на результатах исследования динамики конверсии крахмала, комплексобразователь следует вносить в первые несколько часов ведения ферментализа, поскольку именно в это время отмечалась максимальная скорость накопления ЦД под действием ЦГТаза.

Ферментативную конверсию проводили при температуре 45⁰С и рН 6,0, которые были выбраны исходя из особенностей применяемой для конверсии крахмала ЦГТаза штамма.

Время ведения процесса ограничили 24 часами, так как к этому сроку скорость конверсии крахмала в ЦД замедляется настолько, что дальнейшее ведение процесса нецелесообразно.

3. Выделение, разложение комплекса и получение ЦД.

Для освобождения конверсионной смеси от остаточного крахмала и линейных декстринов был проведен гидролиз реакционной смеси глюкоамилазой при 70⁰С в течение 10 ч, после предварительной инактивации ЦГТаза *P. ehimensis* IB-739 термообработкой при 100⁰С.

Дистилляция получаемой водной суспензии комплекса до объема 50% от первоначального и последующая фильтрация приводит к его разрушению и удалению МЭК и серы.

Таким образом, в лабораторных условиях продемонстрирована возможность получения ЦД полифракционного состава на основе технологии, включающей использование широкоспецифичной ЦГТаза *P. ehimensis* IB-739 и бинарной системы МЭК-Сера в качестве комплексобразователя при конверсии крахмала. Данная технология обеспечивает наличие в конечном продукте трех гомологов α -, β -, γ -ЦД, в соотношении соответствующем нативному, а именно 25,6: 66,3: 8,1 % масс. с общим выходом циклодекстринов до 75%.

ВЫВОДЫ

1. На основании тестирования коллекционных культур выбран штамм, продуцирующий циклодекстринглюканотрансферазу широкой специфичности. Согласно физиолого-биохимическим, культурально-морфологическим характеристикам и последовательности гена 16S рРНК, штамм идентифицирован как *Paenibacillus ehimensis* IB-739.

2. Изучены физико-химические и каталитические свойства ЦГТаза *P. ehimensis* IB-739. Максимальная каталитическая активность проявляется в интервале температур 40–45⁰С, оптимум рН=6,0, рН-стабильность в интервале 5,5–8,5, термостабильность – до 60⁰С.

3. Подобраны условия предподготовки крахмальных растворов высокой концентрации для ферментализа и определены оптимальные параметры ферментативной конверсии крахмала ферментом *P. ehimensis* IB-739 для получения ЦД с нативным соотношением гомологов (ЦД полифракционного

состава): доза фермента 10,0 ед/г субстрата; концентрация крахмала 5,0-15,0%, продолжительность процесса ферментолиза – 8-12 ч.

4. Исследован процесс ферментативной конверсии крахмала с использованием комплексообразователей и разработан бинарный сольвент – МЭК-Сера, обеспечивающий выход ЦД не ниже 75%, при сохранении нативного соотношения гомологов.

5. Разработана схема получения ЦД полифракционного состава, основанная на использовании широкоспецифичного фермента *P. ehimensis* ИВ-739 и нового бинарного сольвента в качестве неспецифичного комплексообразователя.

БЛАГОДАРНОСТИ

Свою искреннюю благодарность автор выражает д.б.н., профессору А.И. Мелентьеву за помощь при подготовке рукописи диссертации. Автор выражает глубокую признательность к.б.н. Е.А. Гильвановой и к.б.н. Е.А. Щелчковой за постоянное внимание и помощь в работе. Автор искренне благодарит всех сотрудников лаборатории прикладной микробиологии ИБ УНЦ РАН за постоянную поддержку в процессе выполнения работы.

Особую признательность и благодарность автор выражает безвременно ушедшему из жизни первому научному руководителю к.б.н., доценту Н.Г. Усанову за идейное вдохновение, научно-методическое руководство и ценные советы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Федорова П.Ю., Усанов Н.Г., Андресон Р.К., Гильванова Е.А. *Paenibacillus ehimensis* ИВ-739 в биотехнологии утилизации нефтяных шламов // Вестник Оренбургского государственного университета.– Спецвыпуск. Проблемы экологии Южного Урала.– 2009.– № 3.– С. 506-508.
2. Федорова П.Ю., Усанов Н.Г., Гильванова Е.А. Бактерии *Paenibacillus ehimensis* – новый источник циклодекстринглюканотрансфераз // Материалы Международной научно-практической конференции «Современная биотехнология: фундаментальные проблемы, инновационные проекты и бионанотехнология», 26 апреля – 8 мая 2010 года, г. Брянск / Изд-во: «Ладомир». –Брянск, 2010.– С. 124-129.
3. Усанов Н.Г., Федорова П.Ю., Гильванова Е.А., Егуткин Н.Л. Метил-трет-бутиловый эфир: новый комплексообразователь для биотехнологии β-циклодекстрина // Материалы Международной научной конференции «Биотехнология начала III тысячелетия», 26 – 28 мая 2010 года, г. Саранск / Изд-во Мордов. ун-та, 2010.– С. 54-55.
4. Федорова П.Ю., Усанов Н.Г., Гильванова Е.А. Бактерии *Paenibacillus ehimensis* – новый продуцент циклодекстринглюканотрансферазы // Материалы VI Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», 25 – 27 октября 2010 года, г. Москва / Изд-во: ООО «МАКС пресс». – Москва, 2010.– С. 159-161.

5. Федорова П.Ю. Бактерии *Paenibacillus ehimensis* – источник циклодекстринглюканотрансфераз // XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2011»; секция «Биология»; 11 – 15 апреля 2011 года; Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет. – М.: МАКС Пресс, 2011.– С. 171.
6. Федорова П.Ю., Усанов Н.Г., Гильванова Е.А. Бактерии *Paenibacillus ehimensis* – новые циклодекстриногенные микроорганизмы // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 15-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых; секция «Биология и экология микроорганизмов», 18 – 22 апреля 2011 года, г. Пушкино.– С. 347.
7. Федорова П.Ю., Гильванова Е.А., Усанов Н.Г. Сравнение кинетических свойств различных циклодекстринглюканотрансфераз // Известия Самарского научного центра Российской академии наук.– 2011.– Т. 13, №5(3).– С. 203-206.
8. Федорова П.Ю., Андресон Р.К., Алехин Е.К., Усанов Н.Г. Природные циклические олигосахариды – циклодекстрины в системах доставки лекарств // Башкирский медицинский вестник.– 2011.– № 4.– С. 125-131.
9. Gilvanova E.A., Aktuganov G.E., Fedorova P.Y., Melentjev A.I., Usanov N.G. *Paenibacillus ehimensis* partial 16S rRNA gene, strain IB-739 // EMBL Nucleotide Sequence Database.- 2009. - Accession number FN582329.