

ПРИМЕНЕНИЕ ИЗОМАЛЬТУЛОЗОСИНТАЗЫ *ERWINIA RHAPONTICI* С ЦЕЛЮ ТРАНСФОРМАЦИИ САХАРОЗЫ В ИЗОМАЛЬТУЛОЗУ

Выбраны оптимальные условия биосинтеза изомальтулозосинтазы бактериями *Erwinia rhapontici* при глубинном культивировании: температура культивирования 30 °С; исходная величина pH питательной среды 7,5; продолжительность культивирования 54 ч на среде с содержанием сахарозы 10%. Получен электрофоретически гомогенный ферментный препарат с удельной активностью 281,67 Е/мг белка. Определены оптимальные параметры трансформации сахарозы в изомальтулозу: дозировка ИС – 5 Е/мг сахарозы, концентрация сахарозы – 10%, время трансформации – 3 ч.

Ключевые слова: биосинтез изомальтулозосинтазы, трансформация сахарозы в изомальтулозу,

Актуальной задачей пищевой биотехнологии является поиск натуральных заменителей сахара, не оказывающих отрицательного влияния на организм человека [1]. Одним из таких сахарозаменителей является изомальтулоза (паламиноза, 6-О-β-D-глюкопиранозид-D-фруктоза) – редуцирующий дисахарид, состоящий из остатков глюкозы и фруктозы. Изомальтулоза не вызывает кариеса зубов, ее переваривание незначительно влияет на концентрацию глюкозы и инсулина в крови. Изомальтулоза не метаболизируется большинством бактерий и дрожжей, устойчива в кислых растворах [2].

За рубежом изомальтулоза и ее гидрогенизированное производное изомальт широко используются как заменитель сахарозы в продуктах диетического и диабетического назначения [3]. Кроме того, Wu и Birch разработали способ получения изомальтулозы из сахарного тростника путем внедрения в его геном гена микробного происхождения, ответственного за синтез фермента изомальтулозосинтазы [4]. Промышленному получению изомальтулозы с использованием клеток бактерий посвящены исследования Kawaguti [5]. Однако в России исследования по получению изомальтулозы отсутствуют. Интерес к изомальтулозе вызван и тем, что данный дисахарид обладает пребиотическими свойствами и способствует развитию полезной микрофлоры желудочно-кишечного тракта, улучшая иммунную систему организма человека.

Превращение сахарозы в изомальтулозу катализирует фермент изомальтулозосинтаза (ИС) КФ 5.4.99.11, также известный как сахарозоизомераза, β-гликозилтрансфераза [6]. ИС была обнаружена у таких родов микроорганизмов, как *Protaminobacter*, *Erwinia*, *Serratia*,

Pseudomonas, *Leuconostoc*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella* [7, 8, 9, 10].

В литературе описывается два типа изомальтулозопродуцирующего фермента [10]. Один из них способствует образованию изомальтулозы как побочного продукта, например, при каталитическом действии фермента декстрансахаразы *Leuconostoc mesenteroides*. Второй тип фермента способствует образованию изомальтулозы как одного из нескольких конечных продуктов в процессе каталитического превращения сахарозы. Однако известные продуценты ИС проявляют недостаточно высокую активность к биосинтезу фермента. В связи с этим поиск высокоактивных продуцентов ИС, исследование физико-химических свойств фермента, изучение динамики трансформации сахарозы в изомальтулозу являются актуальной задачей.

Цель работы – оптимизация условий культивирования бактерий *E. rhapontici* – активного продуцента ИС, исследование физико-химических свойств фермента, изучение динамики трансформации сахарозы в изомальтулозу при оптимальных условиях действия фермента.

Условия эксперимента

Объектом исследования служили бактерии *E. rhapontici* штамм В-9292 (ВКПМ, г. Москва). Для поддержания и выращивания *E. rhapontici* использовали мясо-пептонный агар. Культивирование бактерий проводили на среде следующего состава (г/л): пептон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 10; сахароза – 40. Культуру выращивали в периодических условиях в течение 3 суток при температуре 28-30 °С при pH_{ИСХ} 7,0±0,1.

Отделение культуральной жидкости от бактериальных клеток проводили путем центрифугирования при 8000 г в течение 15 минут. Надо-

садочную жидкость собирали для определения внеклеточной активности фермента. Внутриклеточную активность фермента определяли, отмывая клетки от культуральной жидкости и ресуспендируя в дистиллированной воде.

При изучении влияния начального рН на активность фермента культуру выращивали на среде с сахарозой (4%), в которой устанавливали значения рН от 4,0 до 9,0 с помощью 1 н NaOH или H₂SO₄. Содержание сахарозы в среде культивирования варьировали от 2 до 12%.

Об активности фермента судили по изменению концентрации изомальтулозы, полученной в результате трансформации сахарозы, и выражали в Е/см³ соответственно разбавленной культуры клеток. Количество изомальтулозы определяли по методу Сомоджи – Нельсона [11]. За единицу активности принимали количество фермента, которое образует 1 мкмоль изомальтулозы за 1 минуту.

Очистку фермента проводили при 0-4 °С в несколько стадий.

1. Гомогенат получали разрушением бактериальных клеток с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т при мощности 500 Вт и частоте 22 кГц в течение 2 мин в ледяной бане.

2. Супернатант получали центрифугированием клеточного экстракта при 4000 g в течение 5 минут при 4 °С.

3. Ферментную вытяжку пропускали через колонку (1,5×20 см) с сефадексом G-25 (medium) («Pharmacia», Швеция) для освобождения от низкомолекулярных примесей и элюировали со скоростью 0,5 см³/мин 0,05 М трис-НСl буфером, рН 6,0. Объем наносимого образца не превышал 4 см³. Объем фракций составлял 2 см³.

4. Ионообменную хроматографию (ИОХ) проводили на колонке (1,5×12 см) с ДЭАЭ-целлюлозой («Reanal», Венгрия). Элюцию осуществляли ступенчатым градиентом концентрации KCl (от 0 до 200 мМ) в трис-НСl буфере рН 6,0. Фракции собирали по 2 см³ и определяли в них активность фермента. Скорость элюции составила 0,3 см³/мин.

5. Полученную фракцию наносили на колонку (1,5×10 см) с сефадексом G-150 (superfine) («Pharmacia», Швеция) для очистки от высокомолекулярных примесей и элюировали со скоростью 0,5 см³/мин.

Гомогенность определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле (9%) в течение

2-2,5 ч. при напряжении 260 В и силе тока 8 мА [12]. Для проявления на белок использовали методику с нитратом серебра [13]. ДДС-На-ПААГ-электрофорез осуществляли при концентрации полиакриламидного геля 10% в присутствии 0,1% ДДС-На после обработки фермента 0,1 М меркаптоэтанолом. Использовался 3% концентрирующий гель с рН 6,8 и 10% разделяющий гель с рН 8,8. В качестве калибровочных белков использовали стандартные белковые маркеры («ДиаМ», Москва).

Определение общего количества белка проводили по методу Лоури и др. [14].

Для изучения влияния рН на активность ИС *E. rhapsontici* изомеризацию сахарозы осуществляли в интервале рН 4,0-8,0. Заданное значение рН субстрата поддерживали с помощью ацетатного буфера в зоне рН 4,0-5,0 и фосфатного в зоне рН 6,0-8,0.

Динамику трансформации сахарозы в изомальтулозу изучали при использовании дозровок ферментного препарата ИС от 2 до 18 Е/мг сахарозы, концентрацию сахарозы варьировали в диапазоне значений от 4 до 50%.

Результаты и обсуждение

В результате скрининга микроорганизмов нами был выбран продуцент ИС – *E. rhapsontici*. Активность фермента в 40-50 раз превышала значение активности ранее известных микроорганизмов – продуцентов фермента. В таблице 1 представлена сравнительная характеристика активности ИС различных бактериальных видов.

Определение локализации ИС *E. rhapsontici*.

Из литературных источников известно, что фермент ИС, синтезируемый такими микроорганизмами, как *Serratia plymuthica*, *Protaminobacter rubrum*, имеет внутриклеточную локализацию [10]. Биосинтез ИС выбранного нами продуцента *E. rhapsontici* исследовали при культивировании бактерий в течение 72 часов. Ак-

Таблица 1. Активность ИС различных бактериальных видов

№	Микроорганизмы	Активность ИС, Е/см ³
1	<i>Pantoea dispersa</i> UQ68J	72,0
2	<i>Protaminobacter rubrum</i> CBS574.77	33,0
3	<i>Klebsiella planticola</i> MX-10	4,3
4	<i>Klebsiella planticola</i> CCRC 19112	9,0 - 12,0
5	<i>Klebsiella sp.</i> LX 3	15 - 20
6	<i>Erwinia rhapsontici</i> В 9292	3308,7

тивность фермента определяли через каждые 12 часов культивирования в фильтрате культуральной жидкости и в клеточной суспензии бактерий. Установлено, что клетки бактерий проявляли максимальную активность ИС к 54 часам культивирования, которая составляла 4726,8 Е/см³ соответственно разбавленной культуры клеток. В фильтрате культуральной жидкости активность фермента не была обнаружена.

Оптимизация биосинтеза ИС *E. rhapsontici*.

В качестве факторов, влияющих на биосинтез ИС *E. rhapsontici*, были исследованы следующие: продолжительность культивирования, рН среды, температура культивирования, аэрация, концентрация сахарозы в среде.

Исследование активности ИС от исходного значения рН среды культивирования показало, что максимальный биосинтез ИС бактериями *E. rhapsontici* наблюдался при рН 7,5. Отклонение рН питательной среды от оптимальных для синтеза фермента значений в кислую и в щелочную сторону способствовало снижению активности ИС.

На биосинтез ИС в процессе культивирования *E. rhapsontici* также оказывает влияние температура культивирования. Установлено, что максимальный биосинтез ИС наблюдался при 30 °С. Снижение температуры культивирования до 16 °С или повышение температуры до 40 °С в значительной степени угнетало синтез фермента.

Исследование влияния источников углерода на биосинтез бактериями ИС показало, что ферментативная активность проявляется на разных источниках углерода (глюкоза, фруктоза, мальтоза), однако максимальный биосинтез фермента наблюдался на среде с сахарозой, что согласуется с литературными данными [7]. Оптимальной концентрацией сахарозы для биосинтеза ИС в среде культивирования *E. rhapsontici* являлась концентрация 10%.

Известно, что бактерии *E. rhapsontici* относятся к группе факультативно анаэробных микроорганизмов. Варьируя изменение объема пи-

тательной среды в колбах емкостью 750 см³ от 100 до 350 см³, установили, что максимальное значение активности ИС наблюдалось при содержании питательной среды в колбах в объеме 300 см³, т.е. соотношение объема среды к объему кислорода составляло 1:2,5. Дальнейшее увеличение количества кислорода приводило к снижению активности фермента.

Таким образом, оптимальными условиями для глубинного культивирования бактерий *E. rhapsontici* и биосинтеза ими ИС являются следующие: температура культивирования 30 °С; исходная величина рН питательной среды 7,5; продолжительность культивирования 54 ч. на среде с содержанием сахарозы 10%.

Очистка фермента, его физико-химические характеристики.

Результаты по очистке ИС бактерий *E. rhapsontici* приведены в таблице 2. Был получен гомогенный ферментный препарат со степенью очистки 63,9 и удельной активностью 281,67 Е/мг белка.

Ключевой стадией очистки являлась ионообменная хроматография. Применение в качестве ионообменника ДЭАЭ-целлюлозы позволило получить ИС с высокой степенью очистки (63,9). Пик максимальной активности ИС соответствовал градиенту концентрации КСl, равному 20 мМ, что, вероятно, представляет собой одну изоформу ИС, локализованную в периплазматическом пространстве бактериальной клетки *E. rhapsontici*.

Максимальный выход белка, определенный спектрофотометрически при длине волны 280 нм, наблюдался также при градиенте концентрации КСl, равном 20 мМ, что соответствовало максимальной активности ферментного препарата ИС.

Проведенный электрофоретический анализ очищенного препарата показал наличие одной белковой полосы с R_f = 0,45.

С помощью ДДС-Na-ПААГ-электрофореза установлено, что фермент является мономером. Молекулярная масса нативного фермента

Таблица 2. Очистка ИС из бактерий *E. rhapsontici*

№	Стадии очистки	Общий объем, см ³	Общая активность, ФЕ	Белок, см ³	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
1	Гомогенат	6,8	921,7	209,0	4,41	1	100
2	Супернатант	5,2	803,6	81,6	9,85	2,23	87,2
3	Гель-фильтрация на G-25	4,0	236,3	20,8	11,4	2,6	25,6
4	ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе	3,0	67,5	0,38	177,6	40,3	7,3
5	Гель-фильтрация на G-150	1,5	33,8	0,12	281,7	63,9	3,7

находится в пределах значений 70-80 кДа, что согласуется с данными литературы. Так, в работе McAllister показано, что молекулярная масса нативной ИС *Serratia plymuthica* ATCC 15928 равна 79,5 кДа [10]. ИС, очищенная из *Klebsiella sp.* имеет молекулярную массу 74 кДа [15].

Влияние температуры и рН на активность ИС исследовали в интервале значений температур 20-60 °С и рН 4,0-8,0. Результаты определения оптимальных условий трансформации сахарозы в изомальтулозу показали, что ферментный препарат ИС бактерий *E. rhapontici* проявлял максимум активности при температуре 30 °С и рН 6,0 (рис. 1 а, б), что характерно для ИС из бактерий рода *Erwinia* [5,16].

Полученный гомогенный препарат фермента был исследован для определения его функциональных характеристик. Инактивацию фермента изучали в диапазоне рН 4,0-8,0 и температуры 20-60 °С. Ферментный препарат проявлял наибольшую стабильность в интервале температуры 20-30 °С и рН 6,0-7,0 (рис. 2, 3).

На рисунке представлена кислотная инактивация ферментного препарата ИС с удельной активностью 281,67 Е/мг белка. Отклонение рН и температуры от указанного интервала приводило к снижению активности ИС на 20-40%.

Изучение динамики трансформации сахарозы в изомальтулозу ИС *E. rhapontici*.

Одним из основных факторов, оказывающих значительное влияние на процесс трансформации сахарозы в изомальтулозу, является дозировка ферментного препарата ИС. На рис. 4 представлена зависимость степени трансформации сахарозы от продолжительности процесса при использовании различных дозировок ферментного препарата ИС при 30 °С и рН 6,0.

Внесение 2 Е/мг сахарозы обеспечивало трансформацию субстрата (4%) за 3 ч на 77,5%. При увеличении дозировки препарата до 5 Е/мг сахарозы степень трансформации достигала 95,0%. Внесение 8 Е/мг приводило к тому, что требуемая степень трансформации (не менее 98%) достигалась за 3 ч. Дальнейшее увеличение

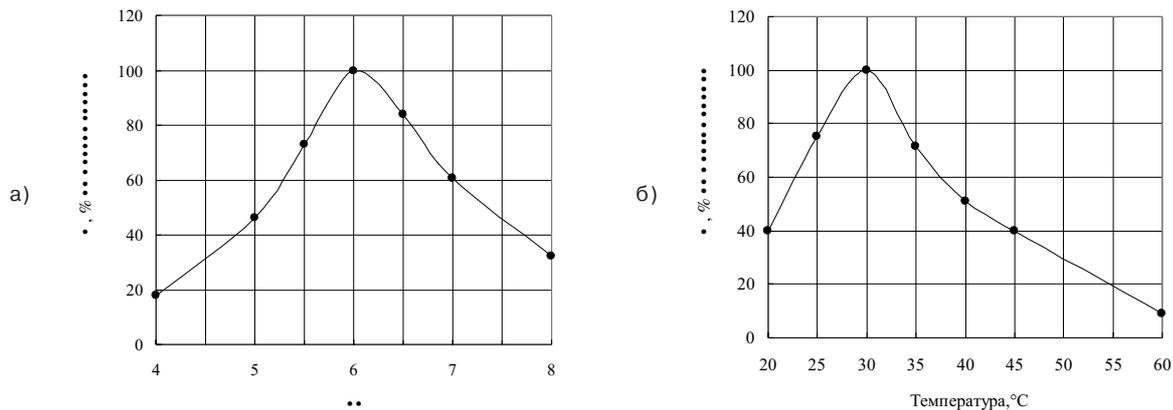


Рисунок 1. а) Влияние рН на активность ИС *E. rhapontici* (А– активность фермента); б) Влияние температуры на активность ИС *E. rhapontici* (А– активность фермента)

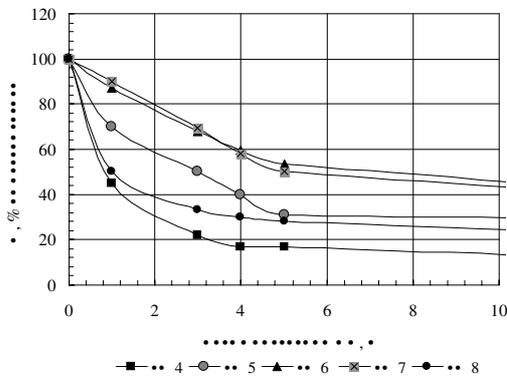


Рисунок 2. Кинетика кислотной инактивации ферментного препарата ИС *E. rhapontici* при 30 °С

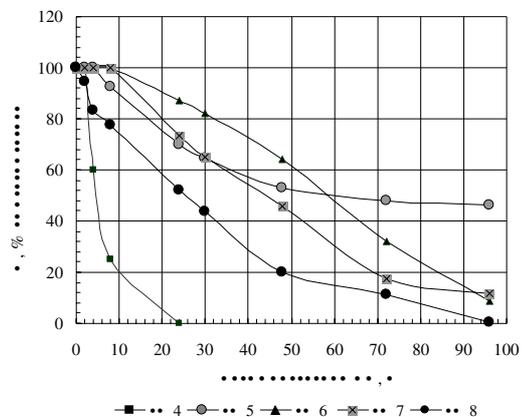


Рисунок 3. Кинетика кислотной инактивации ферментного препарата ИС *E. rhapontici* при 20 °С

дозировки ферментного препарата до 18 Е/мг сахарозы не приводило к значительному усилению степени трансформации и поэтому нецелесообразно.

Важным фактором, от которого зависит действие фермента, является концентрация сахарозы. Зависимость степени трансформации от концентрации сахарозы исследовали при концентрации ферментного препарата 5 Е/мг сахарозы, рН среды 6,0, температура 30 °С (рис. 5).

Как видно из рисунка, при увеличении концентрации сахарозы от 5 до 10% степень трансформации увеличивалась. Если при 5% сахарозы степень трансформации за 3 ч. составляла 61,3%, то при концентрации сахарозы 10% она достигла 87,4%. Дальнейшее увеличение концентрации сахарозы от 20 до 50% приводило к снижению степени трансформации за указанный промежуток времени. Таким образом, концентрация сахарозы 10% является оптимальной для действия ИС. Проведенная серия экспериментов позволила установить следующие рациональные параметры трансформации сахарозы в изомальтулозу: дозировка ИС – 5 Е/мг сахарозы; массовая доля сахарозы – 10%, продолжительность изомеризации 3 ч.

На основании полученных данных в дальнейшем будет разработана биотехнология изомальтулозы с целью получения природного иммуномодулятора.

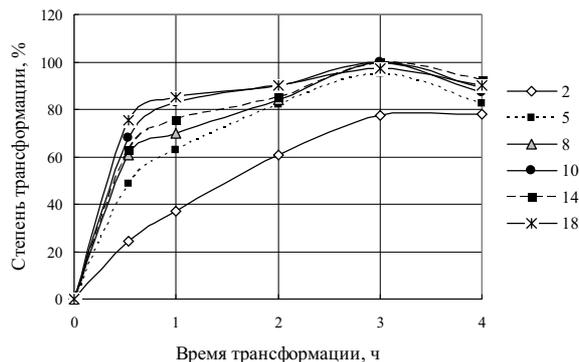


Рисунок 4. Влияние дозировки ферментного препарата ИС (Е/мг сахарозы) на степень трансформации 4% сахарозы

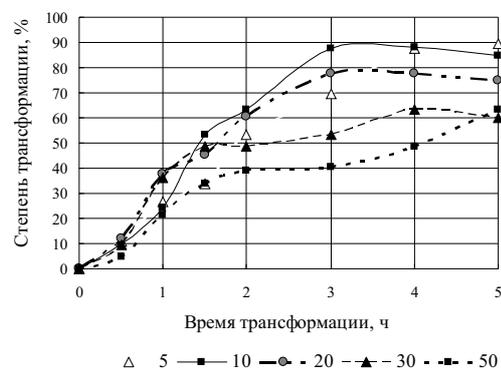


Рисунок 5. Степень трансформации растворов сахарозы различной концентрации (%) ферментным препаратом ИС при дозировке 5 Е/мг сахарозы

Список использованной литературы:

- Bhosale S.H. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase / S.H. Bhosale, M.B. Rao, V.V. Deshpande // Microbiol. Rev. – 1996. – V. 60. – №2. – P. 280 – 300.
- Cheetham P.S.J. The extraction and mechanism of a novel isomaltulose-synthesizing enzyme from *Erwinia rhapontici* / P.S.J. Cheetham // Biochem. J. – 1984. – V. 220. – P. 213 – 220.
- Li X. Substrate induction of isomaltulose synthase in a newly isolated *Klebsiella sp.* LX3 / X. Li, C. Zhao, Q. An, D. Zhang // Journal of Applied Microbiology. – 2003. – V. 95. – P. 521 – 527.
- Wu L. Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer / L. Wu, R. Birch // J. Plant Biotechnology. – 2007. – №5. – P. 109 – 117.
- Kawaguti H.Y. Application of response surface methodology for glucosyltransferase production and conversion of sucrose into isomaltulose using free *Erwinia sp.* cells / H.Y. Kawaguti, E. Manrich, H.H. Sato // Electronic J. Biotechnology. – 2006. – V. 9. – №5. – P. 482 – 493.
- Veronese T. Proposition for the biochemical mechanism occurring in the sucrose isomerase active site / T. Veronese, P. Perlot // FEBS Letters. – 1998. – V. 441. – P. 348 – 352.
- Wu L. Characterization of *Pantoea dispersa* UQ68J: producer of a highly efficient sucrose isomerase for isomaltulose biosynthesis / L. Wu, R. Birch // Journal of Applied Microbiology. – 2004. – V. 97. – P. 93 – 103.
- Huang J.H. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112 / J.H. Huang, L.H. Hsu, Y.C. Su // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 1998. – V. 21. – P. 22 – 27.
- Nagai Y. Characterization of 6-glucosyltransferase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 / Y. Nagai, T. Sugitani, K. Tsuyuki // Biosci. Biotech. Biochem. – 1994. – V. 58. – №10. – P. 1789 – 1793.
- McAllister M. The isomaltulose-synthesizing enzyme of *Serratia plymuthica* / M. McAllister, C.T. Kelly, E. Doyle, W.M. Fogarty // Biotechnol. Lett. – 1990. – V. 12. – P. 667 – 672.
- Somogyi M.J. Determination of reducing sugar / M.J. Somogyi // J. Biol. Chem. – 1952. – V. 195. – P. 19 – 23.
- Гааль Э., Медьешки Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Мир, Москва, 1982, с.149-258.
- Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels / M. Mann // Anal. Chem. – 1996. – V. 68. – №5. – P. 850-858.
- Lowry O.H. Protein estimation with folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Resebrough, A.L. Farr, R.J. Randell // J. Biol. Chem. – 1951. -V. 193. – №1. – P. 265 – 275.
- Park Y.K. Biochemical characterization of a microbial glucosyltransferase that converts sucrose to palatinose / Y.K. Park, R.T. Uekane, H.H. Sato // Revista De Microbiologia. – 1996. – V. 27. – P. 131 – 136.
- Bornke F. Cloning and Characterization of the Gene Cluster for Palatinose Metabolism from the Phytopathogenic Bacterium *Erwinia rhapontici* / F. Bornke, M. Hajirezaei, U. Sonnewald // Journal of Bacteriology. – 2001. – V. 183. – №8. – P. 2425 – 2430.