

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 579.577.15

Г.Б. БРАВОВА, Л.Н. ЛАРИНА, Н.Т. ПЕТРОВА*, И.М. КОЗЛОВ

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники» (ФГБУ «ВНИИИМТ»)
Росздравнадзора, Москва, 115478

e-mail: info@vniimt.org

Свойства пектатлиаз, синтезируемых *Bacillus subtilis* BN-135

Изучены гомогенные фракции пектолитических ферментов, синтезируемых *Bacillus subtilis* BN-135, обладающие близкими значениями молекулярной массы и изоэлектрической точки. Исследование субстратной специфичности, механизма действия на пектин (по характеру разрыва связей — концевой или неупорядоченный), активации ионами Ca^{2+} и ингибирования ЭДТА, а также способности мацерировать растительные ткани показало, что изучаемый комплекс пектолитических ферментов представлен двумя изоформами эндо-пектатлиазы.

Ключевые слова: изоформа, мацерация растительных тканей, пектатлиаза, *Bacillus subtilis*.

Известно, что пектолитические ферменты, катализирующие деполимеризацию пектиновых веществ путем элиминирования α -4,5-D-галактуроната, так же как и полигалактуроназы, расщепляющие пектиновые вещества гидролитическим путем, разделяются по характеру разрыва α -1,4-связей и субстратной специфичности [1]. Пектатлиазы осуществляют неупорядоченное расщепление связей пектиновых веществ в реакции элиминирования с образованием продуктов с двойной связью между 4-м и 5-м атомами углерода. Продукты негидролитического расщепления пектиновых веществ обладают выраженной ультрафиолетовой адсорбцией при длине волны 235 нм [2], а также дают цветную реакцию с тиобарбитуровой кислотой с максимумом поглощения при 550 нм [3].

Пектатлиазы синтезируются различными микроорганизмами; они являются главным патогенным фактором овощей и фруктов, пораженных мягкой гнилью [4—7]. Свойства пектатлиаз, синтезируемых разными микроорганизмами, значительно различаются по субстратной специфичности, оптимальным условиям действия, молекулярной массе и др. [8,9].

Исследованиями ряда ученых было показано, что лиазы пектолитического действия (пектинлиаза и пектатлиаза) по-разному реагируют на ЭДТА и присутствие ионов Ca^{2+} . Многие пектинлиазы не ингибируются ЭДТА и не активируются ионами Ca^{2+} , в то время как пектатлиаза подвержена указанному ингибированию ЭДТА и активации [10—13]. Отмечается абсолютная необходимость

Бравова Галина Борисовна, Ларина Любовь Николаевна, Петрова Наталья Тихоновна, Козлов Игорь Михайлович.

Список сокращений: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ДЭФ — диск-электрофорез; ИЭТ — изоэлектрическая точка; ИЭФ — изоэлектрофокусирование; КЖ — культуральная жидкость; ОП — оптическая плотность; ПААГ — полиакриламидный гель; ТБК — тиобарбитуровая кислота; ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота; SDS — додецилсульфат натрия.

* Автор для переписки.

ионов кальция, которые присутствуют в структуре фермента, для проявления активности пектатлиаз [14]. Однако известны грибные пектинлиазы, которые неактивны в отсутствие ионов Ca^{2+} [15].

В основном бактериальные пектатлиазы, как уже говорилось, осуществляют неупорядоченное расщепление связей пектиновых веществ в ходе реакции элиминирования. При их действии вязкость растворов пектиновых субстратов быстро снижается пропорционально числу разрушенных гликозидных связей. Однако скорость уменьшения вязкости варьирует в значительных пределах для различных ферментов и даже для одного и того же фермента при различных значениях температуры и pH. Эти различия обусловлены реализацией механизма многократной атаки субстрата ферментом, который подобен механизму действия эндополигалактуроназ [14].

Зарубежными и отечественными учеными изучены микроорганизмы, синтезирующие различное количество изоформ пектатлиаз с одинаковыми свойствами, характерными для этой группы ферментов, но имеющих различную молекулярную массу, оптимальными условиями действия (pH и температура) и аминокислотный состав [16—18].

Специфической особенностью пектатлиаз является их способность к катализу процессов мацерации растительных тканей, которые имеют большое практическое значение при хранении и переработке фруктов и овощей, получения лубяных волокон и отдельных растительных клеток, в связи с чем изучению мацерации растительных тканей посвящено много исследований [19—21].

Целью настоящей работы было изучение свойств пектолитических ферментов, продуцируемых *B. subtilis* BN-135, выделенных из культуральной жидкости (КЖ) продуцента и очищенных до гомогенного состояния, для их дальнейшей идентификации в соответствии с действующей номенклатурой ферментов. При изучении механизма действия гомогенных фракций ферментов основное внимание было уделено субстратной специфичности, механизму действия ферментов на пектин по характеру разрыва связей (концевой или неупорядоченный), активации или ингибированию специфическими реагентами и ионами кальция, и способности катализировать процессы мацерации растительных тканей.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Для получения гомогенных форм пектатлиазы использовали спиртоосажденный препарат пектатлиазы, полученный в результате очистки КЖ

продуцента *B. subtilis* BN-135, выращенного глубинным способом на питательной среде, содержащей гидролизат ржаной муки (АОТ «Мелькомбинат в Сокольниках»), кукурузный экстракт (Ефремовский завод глюкозы) и неорганические соли («Химмед», Россия), по следующей схеме:

— отделение биомассы центрифугированием при 9500 g, температуре 5° в течение 30 мин;

— предварительная очистка центрифугата КЖ путем микрофльтрации через мембрану МФЦ («Владипор», Россия) с размером пор 0,6 мкм и последующего ультраконцентрирования (в 10 раз) с помощью мембраны УПМ-50 («Владипор») на микрофльтрационной установке периодического действия «Amicon» (Голландия) (объем ячейки 2500 см³, поверхность фльтрации 0,018 м², рабочее давление 0,2—0,3 МПа) при температуре 18—20° и естественном значении pH;

— осаждение пектатлиазы из концентрата двумя объемами этилового спирта при pH 6,5—6,7 и температуре 10°;

— сушка препарата на лиофильной установке «Charst-2» при температуре 23—27°.

Полученный препарат использовали для последующей очистки пектатлиазы по следующей схеме:

— приготовление 10%-ного раствора препарата в 0,05 М фосфатном буфере, pH 6,4;

— отделение нерастворимого осадка центрифугированием при 9500g, температуре 5° в течение 30 мин;

— обессоливание ферментного раствора методом гель-фльтрации на колонке (3,5×40,0 см) сефадекса G-25 (Pharmacia, Швеция), уравновешенного 0,005 М фосфатным буфером, pH 6,4, с добавлением 10⁻² М ацетата кальция. Элюцию ферментов с колонки осуществляли тем же буфером. Наличие солей в ферментном растворе проверяли с использованием качественных реакций на ионы Cl^- с AgNO_3 и ионы SO_4^{2-} с BaCl_2 ;

— очистка пектатлиазы от сопутствующих ферментов, инертных белков и низкомолекулярных веществ методом ионообменной хроматографии на колонке карбоксиметилцеллюлозы KM-52 (Whatman, Англия) в 0,005 М фосфатном буфере, pH 6,4.

Колонку (2,5×45,0 см) промывали тем же буфером до исчезновения поглощения при λ 280 нм; элюцию проводили градиентом хлористого натрия от 0 до 1 М в 0,005 М фосфатном буфере, pH 7,8. В каждой фракции элюата, соответствующей белковому пику, определяли активность пектатлиазы и содержание белка (спектрофотометрически при λ 280 нм);

— концентрирование активной фракции пектатлиазы в 3 раза с помощью ультрафильтрации через мембрану УПМ-20 («Владипор») при pH 7,5 на микрофильтрационной установке «Amicon»), объем ячейки — 180 см³, поверхность фильтрации — 0,0031 м²;

— фракционирование ферментных белков методом гель-фильтрации на колонке (1,5×100 см) через сефадекс G-100 (Pharmacia), уравновешенный 0,005 М фосфатным буфером, pH 7,0. Раствор концентрированной фракции пектатлиазы, содержащий 20 мг/см³ белка, в количестве 15 см³ нанесли на гель и промывали исходным буферным раствором;

— концентрирование активных фракций пектатлиазы в 5 раз с помощью ультрафильтрации через мембрану УПМ-20 («Владипор») при pH 7,0 на микрофильтрационной установке «Amicon», объем ячейки — 350 см³, поверхность фильтрации — 0,0060 м²;

— получение лиофильно высушенных фракций пектатлиазы I и пектатлиазы II.

Гомогенность полученных препаратов пектатлиазы проверяли с помощью высокоэффективной ионообменной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), изоэлектрофокусирования (ИЭФ) и методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ДЭФ в ПААГ). ВЭЖХ проводили на приборе FPLC (Pharmacia) с использованием колонки моно S, уравновешенной 0,05 М натрий-ацетатным буфером, pH 5,5. Раствор препарата вносили в том же буфере. Элюцию осуществляли натрий-ацетатным буфером с линейно возрастающей от 0 до 1 М концентрацией NaCl. Выход белка регистрировали по поглощению при длине волны 280 нм с помощью ультрафиолетового абсорциометра «Uvicord» (LKB, Швеция).

ИЭФ проводили на установке фирмы LKB при заполнении колонки в соответствии с инструкцией фирмы. На колонку наносили 5 мг белка. В эксперименте применяли амфолины с градиентом pH 3—10 и 8—10. Разделение осуществляли при температуре 4—5°, силе тока 8,0—8,5 мА и напряжении 350—400 В в течение 48 ч. По окончании фокусирования фракции по 2 см³ собирали и в них определяли pH, содержание белка и после диализа — активность пектатлиазы.

Электрофорез в ПААГ проводили на установке фирмы Reanal (Венгрия) согласно инструкции производителя. Для электрофореза в кислой зоне (pH 4,3, концентрация геля 12%) использовали электродный буфер, pH 4,5, а в щелочной (pH 8,9, концентрация геля 7%) — трис-глициновый буфер, pH 8,3.

Молекулярную массу гомогенных фракций пектатлиаз определяли методом гель-фильтрации и методом ДЭФ в ПААГ. Гель-фильтрацию препаратов осуществляли на хроматографе FPLC (Pharmacia) на колонке Superose 12 HR 10/30, уравновешенной 0,05 М трис-HCl-буфером, pH 7,0, содержащим 0,4 М KCl. Молекулярную массу определяли с помощью ДЭФ в 10%-ном ПААГ в денатурирующих условиях с 0,1%-ным SDS на приборе фирмы (Reanal). В качестве белков-маркеров использовали рибонуклеазу (13,7 кДа, Pharmacia, Швеция), химотрипсин (25,0 кДа, Pharmacia), пепсин (35,0 кДа, Sigma), овальбумин (43,0 кДа, Pharmacia), альбумин бычий сывороточный (67,0 кДа, Pharmacia).

Специфичность ферментов изучали по их действию на пектины различной природы с разной степенью этерификации, а также на полигалактуроновую кислоту. В экспериментах были использованы следующие субстраты: пектин свекловичный (РФ, ОСТ 1862-72), степень этерификации 26 и 35%; пектин яблочный (Fluka, Германия), степень этерификации 70—75%; пектин цитрусовый (Sigma), степень этерификации 20—24%; пектин цитрусовый (Fluka), степень этерификации 63—66%; полигалактуроновая кислота (Fluka), степень этерификации 0%.

При изучении влияния специфических активатора и ингибитора на активность пектатлиазы в качестве ингибитора ферментативной активности использовали комплексообразующий агент ЭДТА, а в качестве активатора — ионы Ca²⁺ (CaCl₂, «Химмед»); растворы инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Концентрация фермента в реакционной смеси составляла 1·10⁻³ мг/см³, ЭДТА — 5·10⁻³ М, и Ca²⁺ — 1·10⁻² М.

Механизм действия пектатлиазы на пектин изучали по характеру разрыва связей (концевой или неупорядоченный). Экзо-тип реакции элиминирования пектина (концевой) определяли по увеличению количества восстанавливающих альдегидных групп, эндо-тип реакции — по снижению вязкости раствора пектина. Определение экзополигалактуроназной активности было также основано на учете количества прогидролизированных связей по увеличению конечных альдегидных групп.

Для детекции экзо-механизма реакции после гидролиза 1%-ного раствора пектовой кислоты ферментным раствором (0,2%) к реакционной смеси добавляли 0,1 н. раствор иода и после выдерживания оттитровывали избыток иода 0,05 н. раствором серноватистокислового натрия в присутствии крахмала. За единицу экзополигалактуроназной активности принято количество фермента, которое в условиях определения при 30° катализирует гидро-

лиз 1 мк-экв. гликозидных связей в молекуле пектовой кислоты за 1 мин.

Для детекции экзо-механизма снижение вязкости 1%-ного раствора свекловичного пектина со степенью этерификации 35% под действием ферментов изучали с использованием вискозиметра Оствальда с диаметром капилляра 0,82 мм при pH 8,4, температуре 30° и концентрации фермента в реакционной смеси 0,04%.

Ненасыщенные продукты элиминирования пектина анализировали с помощью ВЭЖХ. В качестве контроля использовали исходный раствор пектина и раствор галактуроновой кислоты (Sigma) — мономера полигалактуроновой кислоты — в концентрации 3 мг/см³. Анализ проводили с использованием хроматографической системы Waters (США), включающей насос модели 501, ультрафиолетовый детектор модели 481 и колонку TSK Gel (Япония) размером 250×4,6 мм. Для элюции использовали 0,15 М раствор NaCl; скорость подачи элюента составляла 1,0 см³/мин; детекцию проводили при длине волны 235 нм. Объем наносимой на колонку пробы составлял 20 мкл. Хроматографию осуществляли при комнатной температуре; хроматограммы регистрировали с помощью самописца Knor&Zonen BD 41.

Активность пектатлиазы определяли с помощью метода, основанного на прямом спектрофотометрическом определении ненасыщенных продуктов элиминирования свекловичного пектина, имеющих максимальную оптическую плотность при длине волны 235 нм [2]. За единицу активности принято такое количество фермента, которое за 1 мин при 40° и pH 8,4 вызывает образование ненасыщенных продуктов деградации пектина, увеличивающих оптическую плотность реакционной смеси в использованных условиях на 0,1 в мин.

Активность пектатлиазы определяли также по количеству окрашенных хромогенов, образующихся при реакции продуктов расщепления пектина с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) («Рехахим», Россия). Количество хромогенов определяли спектрофотометрированием при длине волны 550 нм [22].

В реакционной смеси при определении активности пектатлиазы всегда присутствовали ионы Ca²⁺ (за исключением опытов по влиянию активатора и ингибитора и определению экзо- и эндо-типа реакции).

Процесс мацерации растительных тканей яблока под действием изоформ пектатлиазы *B. subtilis* BN-135 изучали путем микроскопирования срезов растительной ткани толщиной 0,25—0,5 мм, которые помещали на предметное стекло с лун-

кой. В контрольную пробу добавляли 0,5 см³ дистиллированной воды, а в опытные пробы — растворы ферментных препаратов. Пробы закрывали предметным стеклом, помещали в термостат при температуре 40° и выдерживали в течение 4 ч. По окончании процесса воду и раствор фермента удаляли и проводили микроскопирование образца при увеличении 12,5×10. Тонкие срезы растительной ткани получали с помощью санного микротомы.

Способность пектатлиазы мацерировать ткани лубоволокнистых культур определяли путем вымачивания льна в лабораторных условиях при концентрации фермента 0,1% от сухой массы лубяного сырья и температуре 40° в течение 54 ч. Для контроля процесса через каждые 12 ч на первом этапе и через 4—6 ч на завершающей стадии стебли льна вынимали из емкости и визуально определяли степень их мацерации, т.е. легкость отделения пучков волокон от окружающих тканей. Микрофотографии тканей льна получены через 8 ч и через 54 ч от начала процесса мацерации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При ионообменной хроматографии на карбоксиметилцеллюлозе КМ-52 обессоленного раствора препарата был получен несимметричный пик, обладающий активностью пектатлиазы, что свидетельствовало о неомогенности фракции фермента.

В связи с этим проводили дальнейшую очистку и разделение фракций пектатлиазы методом гель-фильтрации через сефадекс G-100, в результате которой наблюдали два симметричных пика, содержащих белковые фракции с пектатлиазной активностью (рис. 1). Для исследования механизма действия пектатлиаз эти фракции были сконцентрированы, лиофильно высушены, и продукты были маркированы как препараты пектатлиаза I и пектатлиаза II, полученные соответственно из фракций I и II.

С использованием методов ВЭЖХ, ДЭФ в ПААГ и ИЭФ была определена степень чистоты ферментных белков препаратов пектатлиазы и установлена их однородность. В частности, в результате ВЭЖХ каждого препарата были получены соответствующие симметричные белковые пики с равномерным распределением удельной активности пектатлиазы (данные не приведены).

ИЭФ полученных высокоочищенных препаратов пектатлиазы, проведенное при предварительном исследовании в градиенте pH 3—10, а затем в более узкой зоне pH 8,0—10,0, показал, что каждый препарат содержит только один белок. Оп-

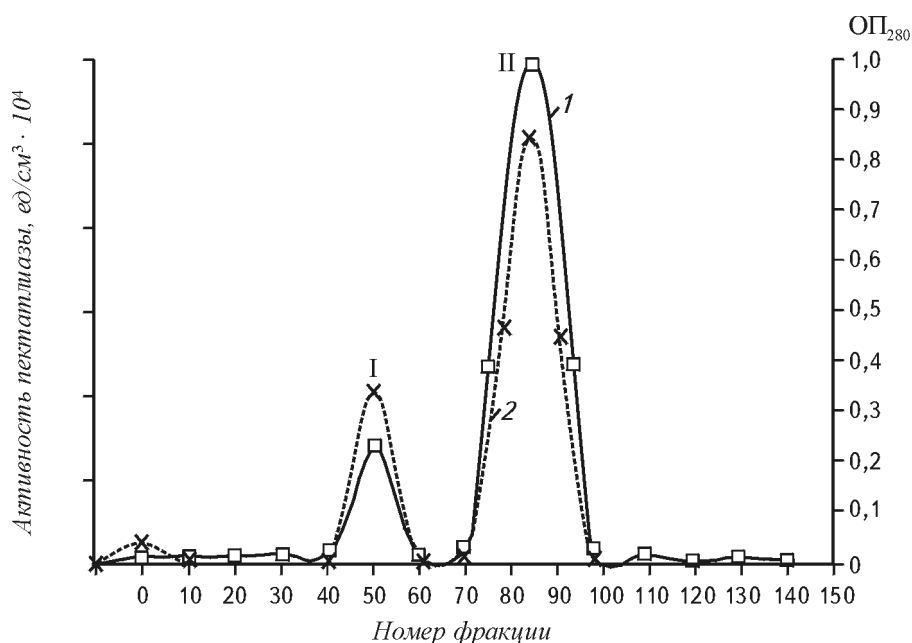


Рис. 1. Гель-фильтрация пектатлиазы на колонке сефадекса G-100: 1 — активность пектатлиазы, ед/см³ · 10⁴; 2 — ОП₂₈₀; I и II — номера пиков

ределение изоэлектрической точки (ИЭТ) очищенных ферментов выявило, что они являются основными белками с близкими значениями ИЭТ: пектатлиаза I имеет ИЭТ 8,4, а пектатлиаза II — 9,8.

ДЭФ в ПААГ высокоочищенных препаратов в щелочной и кислой системах показал, что при pH геля 8,9 (электродный буфер с pH 8,3) весь белок коагулирует и остается на старте. Это является результатом того, что ИЭТ пектатлиаз находится в зоне pH 8,0—10,0. При проведении электрофореза в кислой зоне при pH геля 4,3 видно, что препараты гомогенны и белок выявляется в виде одной полосы (данные не приведены).

Молекулярная масса пектатлиазы I и пектатлиазы II, определенная методом гель-фильтрации в присутствии белков-маркеров, равна 48000 Да и 41000 Да, соответственно. Молекулярная масса, определенная методом ДЭФ в ПААГ, у пектатлиазы I составила 48800 Да, а у пектатлиазы II — 42500 Да. Полученные результаты показали, что оба фермента имеют близкие значения молекулярной массы и изоэлектрической точки.

Таким образом, результаты определения степени чистоты изучаемых ферментных белков с использованием различных методов в совокупности могут свидетельствовать об однородности выделенных фракций пектатлиазы, что дало возможность перейти к изучению свойств пектатлиаз, синтезируемых *B. subtilis* VN-135.

Как известно, пектатлиазы и пектинлиазы расщепляют α-1-4 гликозидные связи при C4 и

удаляют атом Н у C5, образуя 4,5-ненасыщенный галактуронид с максимумом поглощения при λ 235 нм [2]. Были изучены ультрафиолетовые спектры в области 200—300 нм продуктов элиминирования пектина, образующихся под действием исследуемых ферментов. Показано, что максимум их поглощения как при использовании пектатлиазы I (рис. 2), так и пектатлиазы II (рис. 3) наблюдается при длине волны 235 нм. Известно, что ненасыщенные продукты расщепления пектина под действием пектолитических ферментов лиазного действия образуют с ТБК окрашенные хромогены, имеющие максимум поглощения при 550 нм [3]. В связи с этим было проведено определение продуктов ферментативной реакции с использованием ТБК. Полученные спектры в области 500—570 нм показали, что обе фракции пектатлиаз обуславливают образование веществ, имеющих максимум поглощения при λ 550 (см. рис. 2, 3).

Полученные данные подтверждают предположение, что синтезируемые продуцентом ферменты при реакции с пектином образуют 4,5-ненасыщенные галактурониды и, следовательно, являются ферментами лиазного действия.

В соответствии с классификацией ферментов субстратная специфичность пектатлиаз заключается в том, что они более активно атакуют полигалактуроновую кислоту и пектины с низкой степенью метоксилирования, в то время как пектинлиазы, наоборот, с большей скоростью разрушают пектины с высокой степенью метоксилирования и

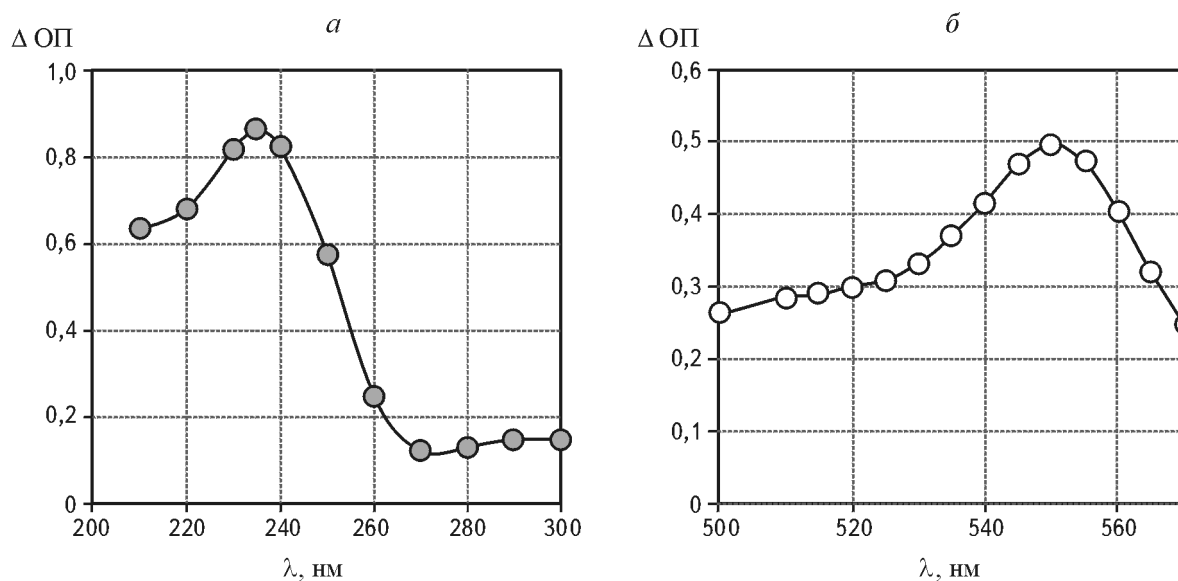


Рис. 2. Анализ продуктов трансэлиминирования пектина при действии пектатлиазы I: *а* — спектрофотометрия при длине волн 200—300 нм; *б* — ОП хромогенов в результате взаимодействия с ТБК при длине волн 500—570 нм

практически не действуют на полигалактуроновую кислоту.

Для выяснения принадлежности двух выделенных высокоочищенных ферментов к тому или другому типу лиаз на основании их субстратной специфичности было исследовано их действие на полигалактуроновую кислоту и пектины с различной степенью метоксилирования. Полученные данные позволяют заключить, что пектатлиазы I и II катализируют трансэлиминирование низко-

токсированного пектина активнее, чем полигалактуроновой кислоты, и менее эффективно, чем высокометоксилированных пектинов (табл. 1). Пектатлиаза I проявляет несколько большую активность, чем пектатлиаза II, при действии на высокометоксилированные пектины.

Иными словами, исследуемые ферменты проявляют максимальную активность при использовании в качестве субстрата низкометоксилированных пектинов и полигалактуроновой кислоты.

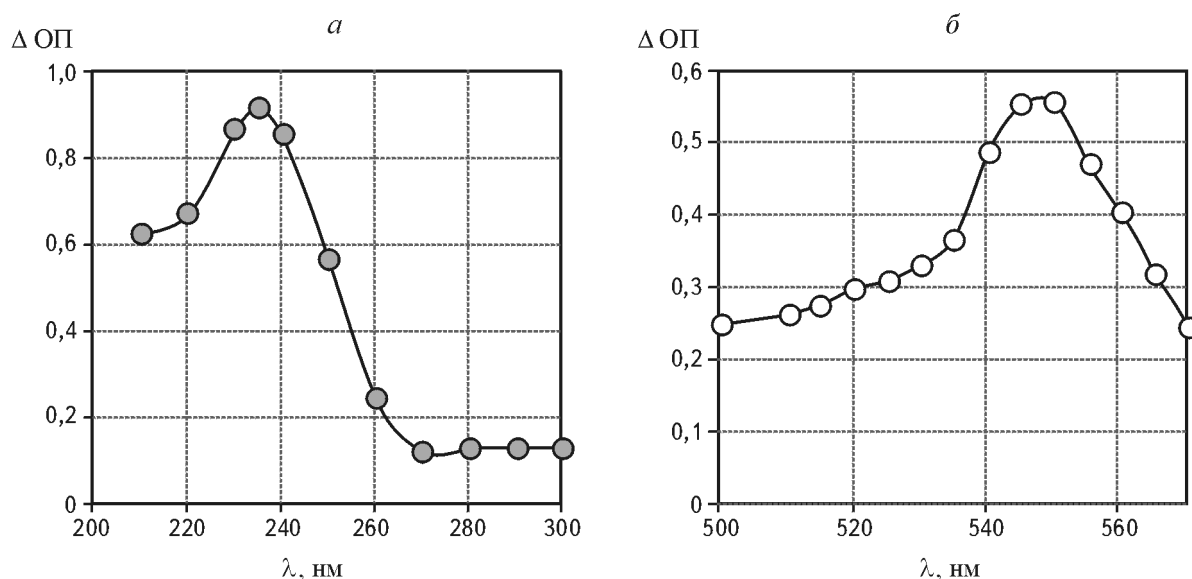


Рис. 3. Анализ продуктов трансэлиминирования пектина при действии пектатлиазы II: *а* — спектрофотометрия при длине волн 200—300 нм; *б* — ОП хромогенов в результате взаимодействия с ТБК при длине волн 500—570 нм

Влияние степени метоксилирования пектиновых веществ на активность высокоочищенных препаратов пектаглиазы

Субстрат	Степень метоксилирования пектиновых веществ, %	Активность, % от активности в отношении свежковичного пектина	
		Пектаглиаза I	Пектаглиаза II
Полигалактуроновая кислота	0	71,9	75,5
Пектин свежковичный	35	100	100,0
Пектин свежковичный	26	96,9	99,2
Пектин цитрусовый	20—24	86,8	78,0
Пектин яблочный	70—75	15,6	5,8
Пектин цитрусовый	63—66	29,3	10,0

Исследовали влияние специфических ингибитора (ЭДТА) и активатора (ионов Ca^{2+}) на активность высокоочищенных препаратов пектаглиазы I и II (табл. 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что оба фермента одинаково реагируют на присутствие специфических ингибитора и активатора, что в совокупности с данными по субстратной специфичности подтверждает предположение о принадлежности ферментов, синтезируемых *B. subtilis* BN-135, к пектаглиазам.

В соответствии с литературными данными, пектаглиазы осуществляют неупорядоченное расщепление связей пектиновых веществ, т.е. реакция элиминирования осуществляется по эндо-типу. При действии пектаглиаз на пектин вязкость растворов пектиновых субстратов быстро снижается пропорционально числу разрушенных гликозидных связей.

С использованием вискозиметрического метода было изучено действие пектаглиазы I и пектаглиазы II на свежковичный пектин со степенью этерификации 35% (рис. 4). Как следует из полученных данных, обе пектаглиазы активно разжижают свежковичный пектин; при этом пектаглиаза II обладает более высокой способностью к снижению вязкости пектина.

Известно, что при реакции экзо-типа с участием пектолитических ферментов воздействию подвергаются концевые α -1,4-связи полигалактуроната начиная от нередуцирующего конца полимерной цепи. При этом освобождаются альдегидные группы, которые можно определить методом иодометрического титрования. Определение альдегидных групп в продуктах реакции трансэлиминирования пектина под действием пектаглиазы I и пектаглиазы II показало их полное отсутствие (данные не приведены).

Влияние ЭДТА и ионов кальция на активность высокоочищенных препаратов пектаглиазы

Препарат	Активность пектаглиазы				
	исходная, ед/г	в присутствии $5 \cdot 10^{-3}$ ЭДТА		в присутствии 10^{-2} М Ca^{2+}	
		ед/г	Ингибирование, %	ед/г	Активация, %
Пектаглиаза I	99860±3455	12745±445	87,2	111960±3677	112,0
Пектаглиаза II	150200±3055	4055±132	97,3	172745±3043	115,0

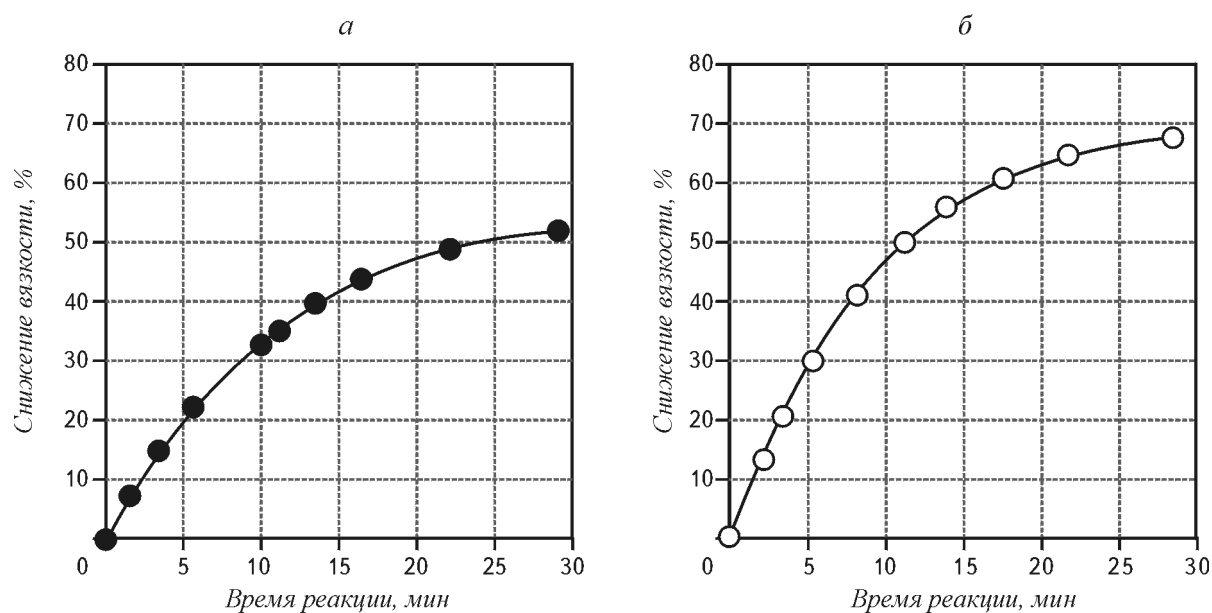


Рис. 4. Снижение вязкости свекловичного пектина (степень этерификации 35%) под действием пектатлиазы I (а) и пектатлиазы II (б)

Эндо-деполимеразный тип действия пектатлиазы I и пектатлиазы II был подтвержден также анализом ненасыщенных продуктов элиминирования пектина методом ВЭЖХ с детекцией при λ 235 нм (рис. 5). Хроматограмма исходного пектина (см. рис. 5, б) показала присутствие продуктов распада пектина с ненасыщенными связями, образовавшихся в щелочной среде буфера, рН 8,4, в том числе наличие незначительного количества галактуроновой кислоты со временем удерживания 3,3 мин (пик Гк, см. рис. 5, а, б).

В процессе трансэлиминирования пектина под действием обеих пектатлиаз помимо олигогалактуронидов с ненасыщенными связями, присутствующих в исходном пектине, наблюдалось образование олигогалактуронидов как низкомолекулярных, так и с более высокой молекулярной массой.

При этом количество галактуроновой кислоты в исходном пектине и в процессе реакции оставалось неизменным независимо от продолжительности ферментализации (пик Гк, см. рис. 5, б, в, г).

Хроматограммы продуктов реакции при действии пектатлиазы I и пектатлиазы II через 30 мин и 3,0 ч показали аналогичный набор олигомеров, но отличались ростом их концентрации с увеличением продолжительности процесса (см. рис. 5, в и г).

Можно также отметить, что с увеличением времени реакции при использовании обеих пектатлиаз наблюдалось повышение содержания низкомолекулярных олигомеров. Это, вероятно, связа-

но с механизмом многократной атаки субстрата ферментом, подобным механизму действия эндополигалактуроназ. При этом сначала отщепляются крупные олигомерные звенья, которые при увеличении времени протекания реакции также подвергаются деградации с образованием более низкомолекулярных галактуронидов.

Полученные результаты свидетельствуют, что выделенные пектатлиазы I и II являются ферментами эндо-типа, т.е. осуществляют неупорядоченное расщепление связей пектиновых веществ, что согласуется с литературными данными о пектатлиазах бактериального происхождения [14, 16].

Учитывая, что пектатлиазы эндо-типа проявляют специфическую способность мацерировать растительную ткань, были проведены исследования по выявлению этой способности у выделенных в гомогенном состоянии ферментов, синтезируемых *B. subtilis* BN-135. Эксперименты проводили с использованием растительных тканей яблока и льна (рис. 6, 7).

При действии препаратов пектатлиазы I и II на ткани яблока процесс мацерации осуществлялся в течение 4 ч. Видно, что в обоих случаях растительная ткань распадается на отдельные клетки; при этом действие пектатлиазы II было выражено более ярко (см. рис. 6).

Процесс мацерации растительных тканей лежит в основе получения волокон в результате вымачивания лубоволокнистых культур, например, льна. В растении волокна льна располагаются в первичной коре в виде волокнистых, или лубя-

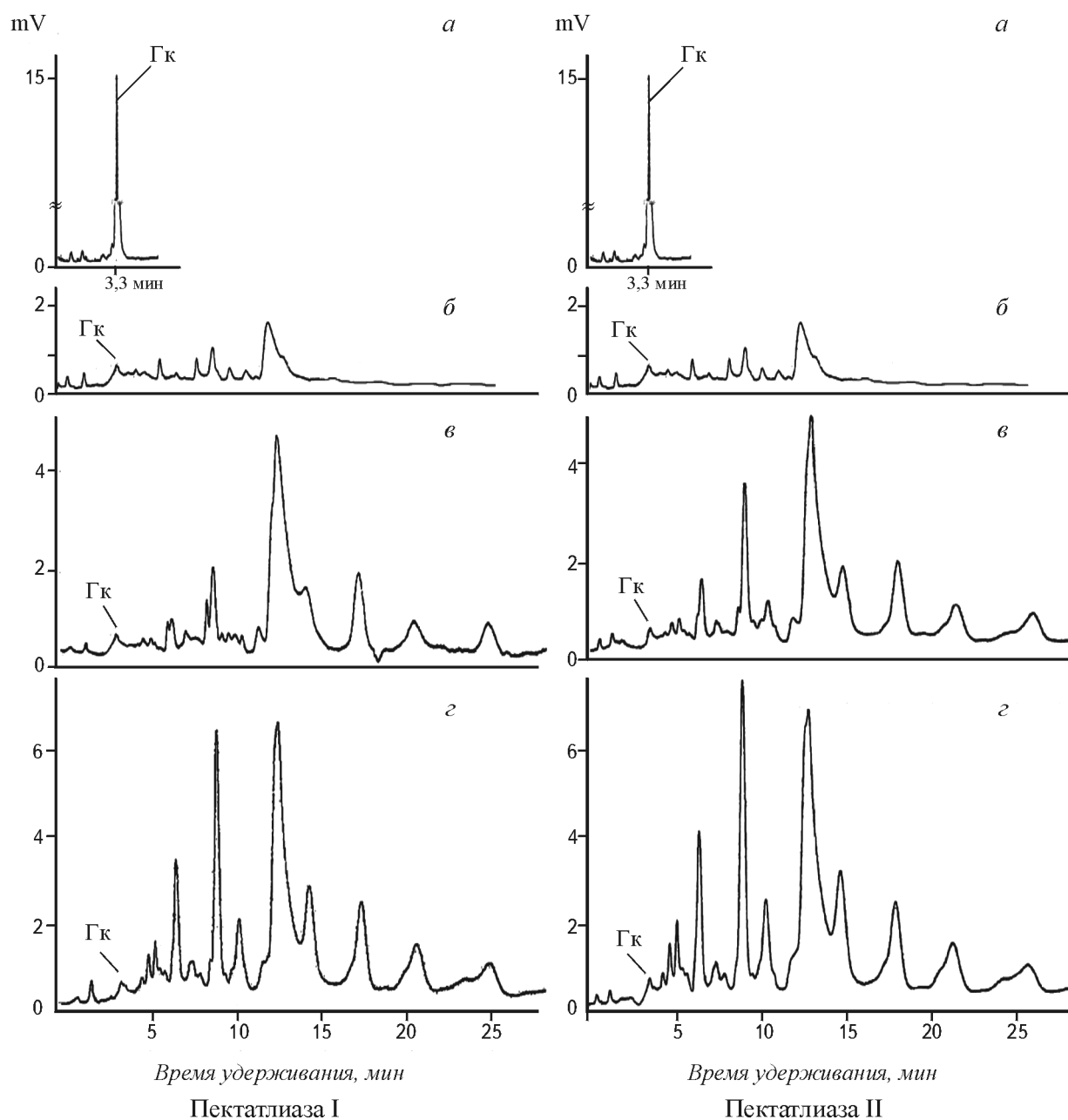


Рис. 5. Хроматограммы продуктов трансэлиминирования пектина под действием пектагилазы I и пектагилазы II. (ВЭЖХ с детекцией при λ 235 нм): а — галактуронозная кислота (Гк) (стандартный препарат); б — исходный пектин (контроль); в — продукты реакции через 30 мин после ее начала; г — продукты реакции через 3 ч. Условия ферментативной реакции: температура 40° , pH 8,4

ных пучков, соединенных между собой и окружающими их тканями пектином. Наличие пектиновых веществ в основном в виде протопектина обуславливает хорошие мацерационные свойства льна. Известно, что биологические процессы при вымачивании льна осуществляются микроорганизмами, в основном пектинразлагающими бакте-

риями *Clostridium felsineum* и *C. pectinofermentas* [23, 24]. При этом плотность пучков волокон уменьшается, что определяет его высокие качества, такие как гибкость и тонкость.

На микрофотографии (см. рис. 7, а) представлены срезы стеблей льна через 8 ч физического вымачивания, когда стебли увлажнились и набуха-

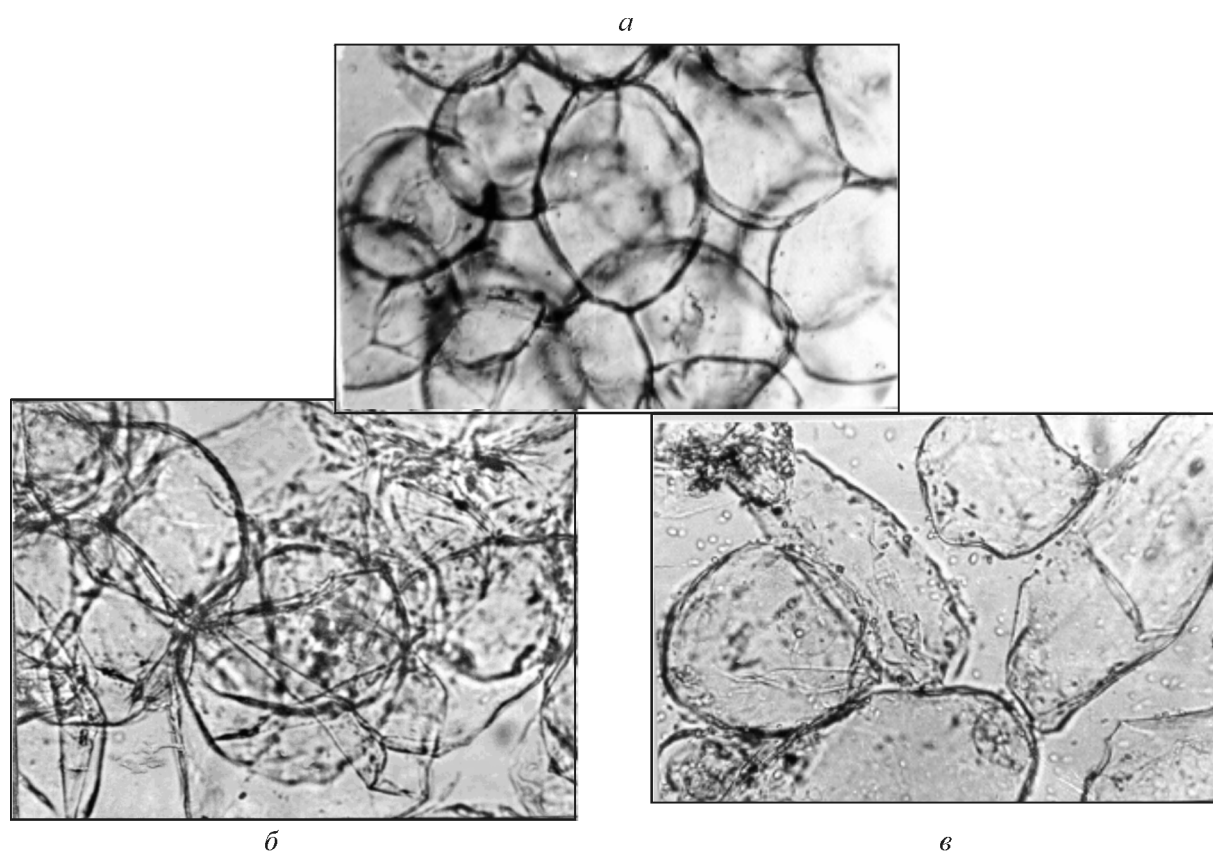


Рис. 6. Микрофотографии тканей яблока технической спелости сорта «Ренет шампанский» (увеличение $\times 125$): *a* — до обработки; *б* — после обработки пектаглиазой I в течение 4 ч; *в* — после обработки пектаглиазой II в течение 4 ч

ли в водном растворе, а также в результате вымачивания в присутствии ферментных препаратов. Последний процесс осуществлялся в течение 54 ч с использованием смеси препаратов пектаглиазы I и пектаглиазы II в соотношении 1:3, в котором они

присутствуют в препарате, осажденном этиловым спиртом (см. рис. 7, *б*).

При использовании исследуемого ферментного препарата в конце процесса вымачивания эпидермис льняной ткани был полностью разрушен,

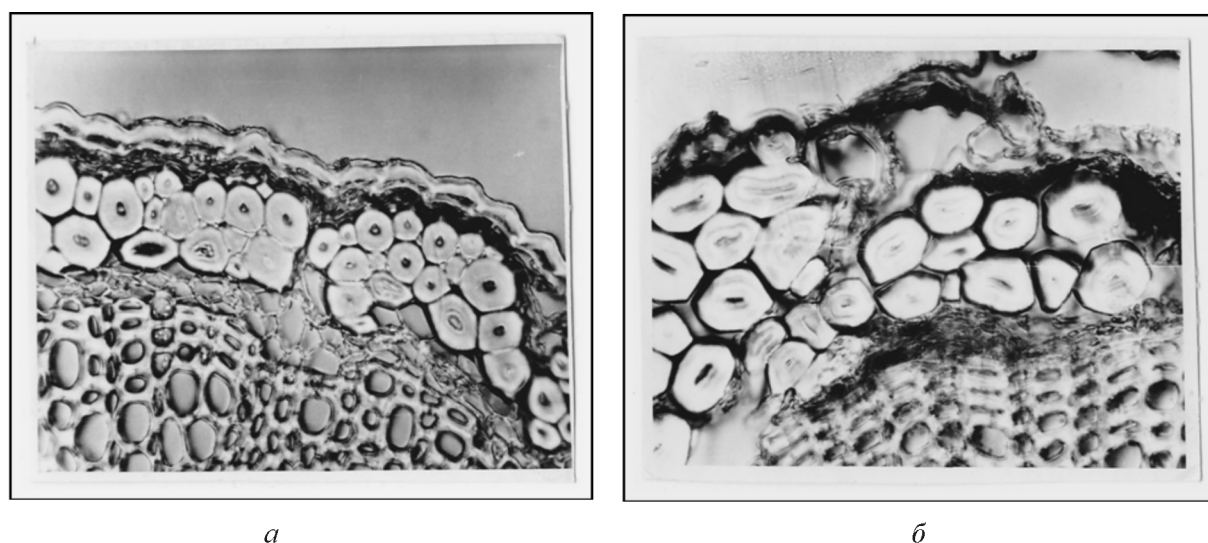


Рис. 7. Микрофотографии тканей льна (увеличение $\times 125$): *a* — после физической фазы набухания через 8 ч от начала процесса теплового вымачивания; *б* — с использованием пектаглиазы I и II (смесь 1:3) через 54 ч от начала процесса

набухшие пучки волокон были отделены от кутикулы и камбия и могли быть легко отделены от древесины.

В контрольном варианте для достижения той же цели процесс теплового вымачивания льна осуществлялся в течение 80—85 ч. Полученные данные свидетельствуют о высоком мацерирующем эффекте изучаемых ферментов.

Таким образом, проведенные исследования показали, что пектолитические ферменты, синтезируемые *B. subtilis* BN-135, являются двумя изоформами пектатлиазы эндо-типа, т.е. энзимами, катализирующими неупорядоченный разрыв гликозидных связей субстрата.

Выявлена высокая способность изучаемых ферментов к мацерации растительной ткани, что также характерно для эндо-пектатлиаз.

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 14.N08.12.0012, заключенного с Министерством образования и науки Российской Федерации.

Получено 26.05.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Номенклатура ферментов. — М.: Наука, 1986. — 56 с.
2. Starr, M.P. Eliminative split of pectin substances by phytopathogenic soft — rot bacterio / M.P. Starr, F.Moran // Sci. — 1962. — V. 135. — P. 920—921.
3. Papavizas, G.C. Polygalacturonate trans-eliminase production by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* / G. C. Papavizas, W. A. Ayers // Phytopath. — 1966. — V. 56. — P. 1269.
4. Almengol-Hecht, M.L. Bacterial spoilage of vegetables and certain fruit / M.L. Almengol-Hecht, A.T. Bull // Microbiol. — 1978. — V. 119. — N2. — P. 7—10.
5. Durand, A. Effect of CO₂ engrowth, condiation and enzyme production in solid-state culture on *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* enzyme / A. Durand, C. Desgranges // Microb. Technol. — 1990. — V. 12. — N. 7. — P. 546—551.
6. Collmer, A. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis / A. Collmer, N.T.Keen // Annu Rev. Phytopathol. — 1986. — V. 24. — P. 383—409.
7. Евтушенков А.Н. Секрция пектатлиаз клетками *Erwinia chrysanthemi* и *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* / А.Н. Евтушенков, Ю.К. Фомичев // Микробиология. — 1996. — Т.65. — В.3. — С.333—338.
8. Рузанова, Л.П. Пектолитические ферменты из *Aspergillus heteromorphus* / Л.П. Рузанова, Н.И. Михалева, И.В. Соловьева // Прикл. биохим. микробиол. — 1996. — Т. 32. — № 2. — С. 3—9.
9. Andersen, L.N., Schulein, M., Lange, N.E.K., Bj. oslashed. rnvad, M.E., Schnorr, K. Pectin degrading enzymes from *Bacillus licheniformis* // Патент US N6165769A, C12N9/40, C12N9/88. 2000.
10. Sakai, T. Pectin, pectinase and protopectinase production, properties and applications / T. Sakai, T. Sakamoto, I. Hallaert // Adv. Appl. Microbiol. — 1993. — N. 39. — P. 213—219.
11. Sakamoto, T. Purification, characterization and production of two pectic-trans-eliminases with protopectinase activity from *Bac. subtilis* / T. Sakamoto, R. Hours, T. Sakai // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 1994. — V. 58. — N 2. — P. 353—358.
12. Silwa, D. Partial purification and properties of pectin-lyase from *Penicillium expansum* / D.Silwa, M. Altwood, D. Tempest // J. Microbiol. Biotechnol. — 1993. — V. 9. — N. 5. — P. 574—578.
13. Seethaler, D. Purification and properties of the pectinolytic enzymes of a flocculent strain of *Clostridium acetobutylicum* / D. Seethaler, W. Hartmeier // Dechema, Biotechnol. Conf. — 1992. — V. 5. — Pt. A. — P. 213—216.
14. Kobayashi, T. Purification and properties of low molecular weight, high-alkaline pectat-lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus* sp. / T. Kobayashi, K. Koike, T. Yoscljimatsu, N. Higaki, A. Suzymatsu, T. Ozawa, Y. Hatada, S. Ito // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 1993. — V. 63, — N. 1. — P. 65—72.
15. Сапунова Л.И. Изучение свойств пектинлиазных препаратов *Penicillium adametzii*, *P. cilrinum* и *P.janthinellum* / Л.И. Сапунова, Р.В. Михайлова, А.Т. Лобанок // Прикл. биохим. микробиол. — 1995. — Т. 31. — № 3. — С. 267—271.
16. Sugiura, J. Purificftion and properties of two pectate lyases produced by *Erwinia carotovora* / J.Sugiura, M. Vasudo, S. Kamimiya, K. Izaki // J. Gen. Appl. Microbiol. — 1984. — V. 30. — N. 3. — P. 167—175.
17. Pissowin, C. Biochemical characterization of the pectat-lyase of *Erwinia chrysanthemi* / C. Pissowin, R. Christine, B. Janine, P. Cotte // Biochim. Biophys. Acta. — 1998. — N. 2. — P. 188—196.
18. Tardy, F. Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysantemi* pectatlyases enzyme characteristics and potential inhibitors / F. Tardy, W. Nasser, J. Robert-Barndoy, P. Cotte // J. Bacteriol. — 1997. — V. 179. — N. 8. — P. 2503—2511.
19. Chesson, A. The maceration of vegetable tissue by a sirain of *Bacillus subtilis* / A. Chesson, R.C. Codner // Fhhl. Bact. — 1978. — V. 44. — N. 3. — P. 347—364.
20. Dean, M. Cell wall degradatien by a pectate trans-eliminase // R.K.S. Wood Natura. — 1967. — N. 214. — P. 408—410.
21. Ishii, S. Maceration of Plant Pissues by trans-eliminase / S. Ishii, T. Jokotsuka // Agric. Biolog. Chemistry. — 1971. — N. 35. — P. 7—10.
22. Чешкова, А. Ферменты и технологии для текстиля, моющих средств, кожи, меха: учеб. пособие для ВУЗов. — Иваново: ГОУВПО ИГХТУ, 2007. — С. 210.
23. Капитонова Л.С. Пектолитические ферменты *Clostridium felsineum* шт. 5 / Л.С. Капитонова, Н.А. Родионова,

Р.В. Фениксова // Прикл. биох. микробиол. — 1972. — Т. 5. — № 8. — С. 539.

24. Бравова Г.Б. Характеристика пектолитических ферментных препаратов из *Clostridium peclinofermentis* 15 / Г.Б. Бравова, К.А. Калунянц, М.В. Самойлова // Прикл. биохим. микробиол. — 1984. — Т. 20. — №. 1. — С. 69—73.

G.B. BRAVOVA, L.N. LARINA, N.T. PETROVA*,
and I.M. KOZLOV.

The All-Russian Research and Experimental Institute for Medical Engineering, Federal Service on Surveillance in Healthcare (FSBI RSRIME, Roszdravnadzor), 115478, Moscow Russia

e-mail: info@vniimt.org

Properties of Pectatliases Synthesized
by *Bacillus subtilis* BN-135

The homogeneous fractions of pectolytic enzymes synthesized by *Bacillus subtilis* BN-135 with similar molecular masses and isoelectric points have been studied. The investigation of substrate specificity, mechanism of action on pectin (by the character of the bond disruption, (limited or unordered)), activation by Ca²⁺ ions and inhibition by EDTA, and also capacity of maceration of plant tissues showed that the pectolytic enzymes complex consists of two isoforms of endo-pectatlyase.

Key words: *Bacillus subtilis*, isoform, pectatlyase, plant tissue maceration.

* Author for correspondence.