

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 579.66

Клонирование и экспрессия β -глюканазы *Bacillus pumilus* Bg57 в *Pichia pastoris*: очистка и характеристика рекомбинантного фермента

© 2018 Л.Н. БОРЩЕВСКАЯ^{1,*}, Т.Л. ГОРДЕЕВА¹, А.Н. КАЛИНИНА¹, Н.В. БУЛУШОВА¹, С.П. СИНЕОКИЙ¹

¹ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»–ГосНИИгенетика), 117545, Москва

*e-mail: larisa.larbor3@yandex.ru

Поступила 20.06.2018 г.

Принята в печать 30.08.2018 г.

Описана изоляция, гетерологическая экспрессия и характеристика новой β -глюканазы из *Bacillus pumilus*. Ген *bgl1* из штамма *Bacillus pumilus* Bg57 ВКПМ В-13195, состоящий из 729 пн, кодирует секретируемую эндо- β -1,3(4)-*D*-глюканазу (Е.С. 3.2.1.6) включающую 214 а.о. и 28 N-концевых аминокислот предполагаемого сигнального пептида. Нуклеотидная последовательность гена *bgl1* и аминокислотная последовательность зрелого белка Bgl имеют наибольшую гомологию с последовательностями β -1,3- и β -1,4-глюканазы *Bacillus licheniformis* (89% и 95% соответственно). Фрагмент гена, кодирующий зрелый белок, был экспрессирован в *Pichia pastoris*. Очищенный рекомбинантный фермент Bgl показал активность на β -глюкане ячменя и лишенине. При использовании β -глюкана ячменя в качестве субстрата оптимальный pH 6 и оптимальная температура 50 °С. K_m и V_{max} имели значения 2,2 мг/мл и 3036,4 мкмоль/мин·мг соответственно. Рекомбинантный белок Bgl показал высокую удельную активность, термостабильность и устойчивость к пищеварительным ферментам. Были также определены другие особенности рекомбинантного фермента, включая pH-стабильность и чувствительность к ионам металлов и химическим реагентам.

Ключевые слова: ферменты, β -глюканаза, рекомбинантные дрожжевые продуценты, *Pichia pastoris*

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-5-12-22

β -глюканы представляют собой семейство полисахаридов, состоящих из мономеров *D*-глюкозы, соединенных посредством β -гликозидных связей и являются естественным компонентом клеточных стенок бактерий, грибов, дрожжей и злаков, таких как овес и ячмень. β -глюканы различного происхождения различаются структурой, уровнем разветвления и молекулярной массой, а также физико-химическими свойствами.

β -глюканы – линейные полисахариды, включающие β -1,3- и β -1,4-связанную *D*-глюкозу. По-

добное же строение имеет также лишенин – полисахарид лишайника *Cetraria islandica* [1]. β -глюканы клеточных стенок дрожжей и грибов содержат 1,3-связанный углеродный скелет с удлинёнными 1,6-боковыми ветвями. Целлюлоза также относится к β -глюканам, ее молекулы представляют собой неразветвленные цепочки из остатков β -глюкозы, соединенных гликозидными связями β -(1→4).

β -глюканазы – группа ферментов, катализирующих расщепление β -глюканов с β -1,2-, β -1,3-, β -1,4- и β -1,6-связями. Согласно Номенклатуре

Список сокращений: ДНС-метод – метод определения ферментативной активности β -глюканазы с ДНС-реактивом (3,5-динитросалициловая кислота); КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; ПЦР – полимеразная цепная реакция; СДС – додецилсульфат натрия (SDS); ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; YPD – дрожжевой экстракт (Yeast Extract Peptone Dextrose); SDS-PAGE – анализ методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия.

ферментов, в нее входят шесть энзимов: **1)** 1,4-(1,3:1,4)- β -D-Глюкан-4-глюканогидролаза (Е.С. 3.2.1.4), рабочее название – целлюлаза или эндо-1,4- β -глюканаза. Фермент гидролизует β -1,4-связи в целлюлозе и других β -глюканах с беспорядочным разрывом связей неконцевых звеньев; **2)** 1,3-(1,3:1,4)- β -D-Глюкан-3(4)-глюканогидролаза (Е.С. 3.2.1.6), рабочее название – эндо-1,3(4)- β -глюканаза или ламинариназа, или эндо-1,3-глюканаза. Фермент эндогенно катализирует гидролитическое расщепление внутренних β -1,3- или β -1,4-связей в β -глюканах, у которых глюкозный остаток замещен в положении C₃ [2]; **3)** 1,3- β -D-Глюкан-глюканогидролаза (Е.С. 3.2.1.39), рабочее название – эндо-1,3- β -глюканаза или ламинариназа. Фермент гидролизует преимущественно 1,3- β -глюкозидные связи в 1,3- β -D-глюканах; **4)** 1,3-1,4- β -D-Глюкан-4-глюканогидролаза (Е.С. 3.2.1.73), рабочее название – лихеназа. Фермент гидролизует 1,4- β -глюкозидные связи в β -D-глюканах, имеющих 1,3- и 1,4-связи [3]; **5)** 1,6- β -D-глюканогидролаза (Е.С. 3.2.1.75) рабочее название – эндо-1,6- β -глюканаза. Фермент беспорядочно гидролизует β -1,6-связи внутри молекулы субстрата; **6)** 1,2- β -D-Глюкан-глюканогидролаза (КФ 3.2.1.71) имеет рекомендуемое название эндо-1,2- β -глюканаза. Фермент расщепляет внутримолекулярные β -1,2-связи в 1,2- β -D-глюканах.

β -1,3-1,4-глюканазы бактерий принадлежат семейству гидролаз 16 (GH16). Гены β -1,3-1,4-глюканазы были клонированы и изучены из нескольких видов семейства Bacillaceae: *Bacillus subtilis* [4, 5], *B. amyloliquefaciens* [6], *B. licheniformis* [7, 8], *B. macerans* [9], *B. halodurans* [10], *B. altitudinis* [11], и *Paenibacillus polymyxa* [12]. Также были клонированы и выражены гетерологически гены β -1,3-1,4-глюконазы из небациллярных видов: *Clostridium thermocellum* [13], *Streptococcus bovis* [14], *Fibrobacter succinogenes* [15], *Rhizopus arrhizus* [16], *Cellvibrio mixtus* [17], *Rhodothermus marinus* [18], *Pyrococcus furiosus* [19], *Cochilobolus carbonum* [20], *Phaffia rhodozyma* [21] и *Phanerochaete chrysosporium* [22].

β -1,3-1,4-глюканазы применяются как промышленные ферменты в пивоварении и при производстве пищевых добавок [23]. Применение β -глюканаз в процессе пивной ферментации приводит к увеличению экстракции семян ячменя и уменьшению количества сусла, снижению образования избыточной вязкости и осадка в пиве. β -1,3-1,4-глюканазы применяются также в качестве добавки к кормам сельскохозяйственных жи-

вотных с однокамерным желудком. В птицеводческих и свиноводческих отраслях водорастворимый некрахмальный полисахарид β -глюкан действует как антипитательный агент. Смешение корма для домашних животных с ферментами β -1,3-1,4-глюканазы и ксиланазы способствует увеличению веса, потреблению корма и усвояемости азота (+5,6%) и липидов (+6,2%), а также снижению образования липкого помета, что облегчает санитарную обработку [24].

Поиск новых высокоактивных β -глюканаз, обладающих свойствами, необходимыми для их промышленного использования, представляет актуальную задачу для биотехнологии.

Цель настоящего исследования – клонирование и экспрессия гена β -глюканазы в экспрессионной системе метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* и исследование свойств рекомбинантного фермента.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Микроорганизмы, плазмиды и среды культивирования

Штамм *Bacillus pumilus* Bg57, способный синтезировать β -глюканазу, был изолирован из образца лесной почвы Московской области, Россия, и депонирован в ВКПМ под номером В-13195.

Для экспрессии в дрожжевой системе был использован штамм *Pichia pastoris* ВКПМ Y-2837 (His⁻) и вектор pPIC-GAP ВКПМ В-10978.

Для клонирования был использован штамм *Escherichia coli* XL1-Blue (*endA1 supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac hsdR17 F'*[proAB lacIqZ Δ M15 Tn10] ВКПМ В-9838).

LB-среда (0,5%-ный дрожжевой экстракт («ДиаЭМ», Россия), 1%-ный триптон («ДиаЭМ»), 1%-ный NaCl («Химмед», Россия)) была использована для культивирования *Escherichia coli* XL1-Blue. YPD-среда (1%-ный дрожжевой экстракт («ДиаЭМ»), 1,5%-ный триптон («ДиаЭМ»), 2%-ная глюкоза («Химмед»)) была использована для роста и экспрессии протеина в *P. pastoris*.

Программы и серверы для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с использованием программ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и NCBI ORF Finder Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Для поиска возможных

сигнальных последовательностей была использована программа SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), для филогенетического анализа – программа CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>), для исследования трехмерных структур ферментов – сервер SWISS-MODEL (<http://swiss-model.expasy.org>), для поиска сайтов гликозилирования – сервер NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Клонирование гена

Для амплификации гена *bgl1*, кодирующего β-глюканазу, были использованы специфические праймеры Bg-1 (5'-ATGTCTTACCGTGTAAAACGAA-3') и Bg-2 (5'-TTATCTTTTGTGTAACGCA-3')

Ген *bgl1* секвенировали и депонировали в Genbank (№ MN553379). Ген, кодирующий β-глюканазу, клонировали в вектор pPIC-GAP и экспрессировали в *Pichia pastoris*.

Конструирование рекомбинантной экспрессионной плазмиды

Фрагмент ДНК, кодирующий зрелый белок Bgl, был амплифицирован с использованием ПЦР *Pfu* ДНК-полимеразы (Fermentas) и двух синтетических праймеров (BgPum-f и BgPum-r). Праймер BgPum-f, 5'-AAAGAATTCGGTTATGTGTCTGGGAACCTC-3', содержит EcoRI сайт и праймер BgPum-r, 5'-AAAGCGGCCGCTTATCTTTTGTGTAACGCA-3', содержит сайт NotI. Амплифицированный продукт, кодирующий зрелый фермент β-глюканазу, был клонирован в состав вектора pPIC-GAP, в результате чего была получена рекомбинантная плазида, pPIC-GAP-BgPgl. Последовательность, кодирующая β-глюканазу, была встроена в рамку считывания с сигнальной последовательностью вектора.

Экспрессия и ферментация β-глюканазы в *P. pastoris*

Плазида pPIC-GAP-Bgl была линейаризована с использованием рестриктазы BglII и трансформирована в клетки штамма *P. pastoris* ВКПМ Y-2837 методом электропорации (http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf). Экспрессионная кассета была встроена в АОХ1 локус посредством гомологической рекомбинации.

Рекомбинантные клоны выращивали в среде YPD в течение 20 ч. при 30 °С и аэрации 250 об/мин. Клетки пересевали в пробирки со средой YPD в соотношении 1:10, растили в течение

4 сут при 30 °С и аэрации 250 об/мин. Через каждые 24 ч добавляли 2% глюкозы. После окончания ферментации определялась активность фермента. Клон с самой высокой активностью β-глюканазы отбирался для дальнейших исследований.

Очистка рекомбинантной β-глюканазы

Культуральная жидкость была предварительно отмыта от низкомолекулярных компонентов среды на установке для ультрафильтрации VivaFlow (Sartorius, Германия) с использованием мембранного модуля с порогом отсечения 10 кДа. Очистка белка проводилась методом катионообменной хроматографии. Полученный ретентат наносили на колонку HiTrap SP (GE Healthcare, Великобритания), содержащую сорбент (SP-сефароза), уравновешенный 20 мМ натрия цитрата буферным раствором (pH 4,5). Элюцию белка осуществляли ступенчатым градиентом концентрации хлористого натрия в том же буфере. Целевой белок элюировали с колонки при 0,25M NaCl.

Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда.

Белковый электрофорез

Белковый электрофорез проводили в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии SDS в камере для вертикального электрофореза Mini-Protean Tetra Cell («Bio-Rad Laboratories», США) 1 ч при напряжении 50 В, затем 2-3 ч при напряжении 150 В. Окраску белков проводили с использованием 0,1%-ного раствора Кумасси голубого R250 («ДиаЭМ»).

Анализ ферментативной активности

Стандартное определение активности β-глюканазы проводили в 100 мкл, смешивая 50 мкл 1%-ного раствора субстрата в 0,5 М ацетатном буфере (pH 6) и 50 мкл образца фермента. Инкубацию проводили 10 мин при 50 °С.

Редуцированные сахара определяли ДНС-методом с использованием глюкозы в качестве стандарта [25].

Одна единица активности фермента определялась как количество фермента, требуемого для образования 1 мкМ редуцированных сахаров за 1 мин.

Субстратную специфичность определяли измерением активности с использованием в качестве субстрата β-глюкана ячменя (Megazame, США), лихенина (Serva, Германия), ксилана березы (Sigma, США), карбоксиметилцеллюлозы («Химмед»).

Характеристика рекомбинантного протеина Bgl

Оптимум pH определяли инкубацией очищенного рекомбинантного белка Bgl с использованием в качестве субстрата β -глюкана ячменя в буферах: 0,5 М глициновый (pH 2–3), 0,5 М ацетатный (pH 4–8), 0,5 М трис-буфер (pH 9).

Влияние pH на стабильность Bgl оценивали с использованием тех же буферных систем в диапазоне pH 2–9.

Температурный оптимум определяли, проводя стандартное исследование активности фермента в диапазоне температур 20–70 °С.

Термостабильность была определена измерением остаточной активности фермента после инкубации при 70, 80, и 90 °С в течение 10 мин для каждой температуры. Остаточная активность измерялась стандартным методом.

Определение влияния ионов металлов и химических реактивов на реакции гидролиза β -глюкана проводилось измерением активности фермента в буфере с добавлением 1мМ соответствующих ионов.

K_m и V_{max} , рекомбинантного Bgl определяли методом Лайнуивера-Берка (Lineweaver-Burk), измеряя активность фермента при 50 °С в 0,5 М ацетатном буфере pH 6 с использованием 0,5–10 мг/мл β -глюкана ячменя в качестве субстрата.

Эффект устойчивости к протеолитическим ферментам был изучен 15-минутным инкубированием Bgl в присутствии 0,1%-ного раствора пепсина при pH 2 и 0,1%-ного раствора трипсина при 37 °С, pH 7 с последующим измерением остаточной специфической активности.

В работе были использованы реактивы отечественного производства марок хч и чда («Химмед»).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штамм Bg57, способный к росту на β -глюкане ячменя в качестве единственного источника углерода и к секреции активной β -глюканазы, был выделен из проб почвы лесной зоны Московской обл.

Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA (GenBank, № MH553380) позволил идентифицировать этот штамм как *Bacillus pumilus*.

В отсутствие характеристики β -глюканазы *Bacillus pumilus*, на основании секвенированных геномов штаммов этого вида были предсказаны гены, кодирующие этот фермент. Проанализировали доступные последовательности генов *Bacillus pumilus*, предположительно кодирующих β -глюканазу, выбрали консервативные участки и на их основании сконструировали праймеры Bg-1 (5'-ATGTCTTACCGTGTAACGAA-3') и Bg-2 (5'-TTATCTTTTGTGTAACGCA-3') для амплификации гена β -глюканазы.

Методом ПЦР был получен фрагмент ДНК, нуклеотидный анализ которого показал, что он представляет собой кодирующую область гена *bgl1* размером 729 пн, трансляционный продукт которого представляет собой пептид Bgl, состоящий из 242 а.о. с молекулярной массой 24,3 кДа.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности имели гомологию с β -глюканазой *Bacillus subtilis* (81 и 86%, соответственно) [26], *Bacillus licheniformis* (89 и 95%) [27], *Paenibacillus polymyxa* (73 и 78%) [28]. Аминокислотные последовательности всех этих ферментов имели структуры, характерные для гликозилгидролаз семейства GH16 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>).

Анализ аминокислотной последовательности с использованием программы SignalP позволил определить возможную сигнальную последовательность, которая составила 28 N-концевых аминокислот. Таким образом, была определена последовательность зрелого белка Bgl (рис. 1).

Анализ аминокислотной последовательности на основании множественного выравнивания, анализ пространственной структуры, проведенный с использованием информационных ресурсов базы данных NCBI, а также анализ предполагаемой трехмерной модели Bgl, предсказанной

MYRMKRMLMLLVTGLVLSLSTFTAGASAQTGGSFYEPFNNYNTGLWQKADGYSNGNMF**NCT**WR
AN**NV**SMTSSGEMRLSLTSSAYNKFDCGEN**NR**STQTYGYGLYEVNMKPAKNVGVSSFFTYTGPTDGT
PWDEIDIEFLGKDTTKVQFNYYTNGVGNHEKIVNLGFDAANSYHTYAFDWQPNSIKWYVDGQLKH
TATTQIPQTPGKIMMNLWNGAGVDEWLGSYNGVTPLHANHYNWVRYTKR

Рис. 1. Аминокислотная последовательность Bgl. Подчеркиванием обозначена возможная сигнальная последовательность; жирным шрифтом выделены возможные сайты N-гликозилирования

Fig. 1. The amino acid sequence Bgl. Underlining indicates a possible signal sequence; in bold, possible sites of N-glycosylation

с использованием сервера SWISS-MODEL на основании структуры наиболее гомологичной β-глюканазы *Bacillus licheniformis* [29], позволили выявить аминокислоты консервативного мотива гидролаз семейства GH16, аминокислоты активного центра и субстрат-связывающей области данного семейства ферментов (рис. 2).

Для экспрессии рекомбинантного белка Bgl в *P. pastoris* была использована плаزمида pPIC-GAP, позволяющая осуществлять высокоуровневую конститутивную экспрессию гетерологического гена под контролем GAP-промотора.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая область зрелого белка Bgl, была амплифицирована методом ПЦР с использованием праймеров BgPum-f и BgPum-r и клонирована в единую рамку считывания с сигнальной последовательностью α-фактора. Таким образом, была сконструирована экспрессионная плазмида pPIC-GA-Bgl (рис. 3).

Экспрессионная плазмида была линейризована и трансформирована в клетки *P. pastoris*. Трансформант Bgl-28 показал самую высокую β-глюканазную активность среди 156 положительных клонов.

Ферментация клона Bgl-28 проводилась в 500 мл колбе в течение 120 ч. Образцы объемом 1 мл отбирались каждые 24 ч. Результаты SDS-PAGE анализа показали, что концентрация рекомбинантного белка Bgl увеличивалась с увеличением времени ферментации. Уровень секреции Bgl, определяемый β-глюканазной активностью, также увеличивался. Ферментативная активность к концу ферментации достигала 350 ед/мл.

Рекомбинантный фермент был очищен до электрофоретической однородности ультрафильтрацией и катионообменной хроматографией.

Молекулярный вес очищенного рекомбинантного фермента при SDS-PAGE анализе был

Bgl P.polym	-----ANVFWEPLSYYPSTWQKADGYSNGDMFN	29
Bgl B.sub	-MPYLKRVLLLLVTGLFMSLFAVTATASAQTGGSFDPFNGYNSGFWQKADGYSNGNMFN	59
Bgl B.pum	-MYRMKRMLMLLVTLGLVLSLSTFTAGASAQTGGSFYEPFNNYNTGLWQKADGYSNGNMFN	59
Bgl B.lich	MSYRVKRMLMLLVTLGLFSLSTFAASASAQTGGSFYEPFNNYNTGLWQKADGYSNGNMFN	60
	.. *:::*. ** . *****:***	
Bgl P.polym	CTWRANNVNFINDGKMKLSLTSAYNKFDGGEYRSKNTYRYGLYEVNMPAKNTGIVSSF	89
Bgl B.sub	CTWRANVSMSTSLGEMRLALTSAPYNKFDGGENRSVQTYGYGLYEVNMPAKNTGIVSSF	119
Bgl B.pum	CTWRANVSMSTSLGEMRLSLTSSAANKFDGGENRSTQTYGYGLYEVNMPAKNVGIVSSF	119
Bgl B.lich	CTWRANVSMSTSLGEMRLSLTSPANKFDGENRSVQTYGYGLYEVNMPAKNVGIVSSF	120
	*****:*. *:::*.*** :***** ** ** :** *****.*****.*****	
Bgl P.polym	FTYTGPNAGTQWDEIDIEFLGKDTTKVQFNYYTNGIGGHEKVVDLGFDASSGFHTYAFDW	149
Bgl B.sub	FTYTGPTDGTQWDEIDIEFLGKDTTKVQFNYYTNGAGNHEKIVDLGFDAAAYHTYAFDW	179
Bgl B.pum	FTYTGPTDGTQWDEIDIEFLGKDTTKVQFNYYTNGVGNHEKIVNLGFDAAANSYHTYAFDW	179
Bgl B.lich	FTYTGPTDGTQWDEIDIEFLGKDTTKVQFNYYTNGVGNHEKIVNLGFDAAANSYHTYAFDW	180
	*****:*. ** ********** *:::*.***:*****:..:*****	
Bgl P.polym	QPGYIKWYVDGVLKHTATTNIPKTPGQIMMNLWNGTGVDSWLGPYNGVNPPLYAEYDWWVKY	209
Bgl B.sub	QPNSIKWYVDGQLKHTATTNQIPTTLGKIMMNLWNGTGVDWLGSYNGVNPPLYAHYDWWVRY	239
Bgl B.pum	QPNSIKWYVDGQLKHTATTQIPQTPGKIMMNLWNGAGVDEWLGSYNGVTPPLHAHYNWVRY	239
Bgl B.lich	QPNSIKWYVDGQLKHTATTQIPQTPGKIMMNLWNGAGVDEWLGSYNGVTPLSRSLHWVRY	240
	** . ***** *****:*. ** * *:::*****:***.*** *****. ** . **:	
Bgl P.polym	TSN	212
Bgl B.sub	TKK	242
Bgl B.pum	TKR	242
Bgl B.lich	TKR	243
	*..	

Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей Bgl и родственных ему ферментов. Bgl B.pum – β-глюканаза *Bacillus pumilus*; Bgl B.lich – β-глюканаза *Bacillus licheniformis*; Bgl B.sub – β-глюканаза *Bacillus subtilis*; Bgl P.polym – β-глюканаза *Paenibacillus polymyxa*. Красная рамка – ключевые аминокислоты, входящие в активный центр ферментов; Синяя рамка – консервативный мотив гидролаз семейства GH-16; Зеленая рамка – аминокислотные замены в субстрат-связывающей области ферментов

Fig. 2. Alignment of amino acid sequences of Bgl and related enzymes. Bgl B.pum - β-glucanase *Bacillus pumilus*; Bgl B.lich - β-glucanase *Bacillus licheniformis*; Bgl B.sub-β-glucanase *Bacillus subtilis*; Bgl P.polym - β-glucanase *Paenibacillus polymyxa*. Red highlighted key amino acids that are part of the active center of enzymes. Blue denotes conserved motif hydrolase family GH-16. Green shows amino acid substitutions in the substrate-binding region of enzymes

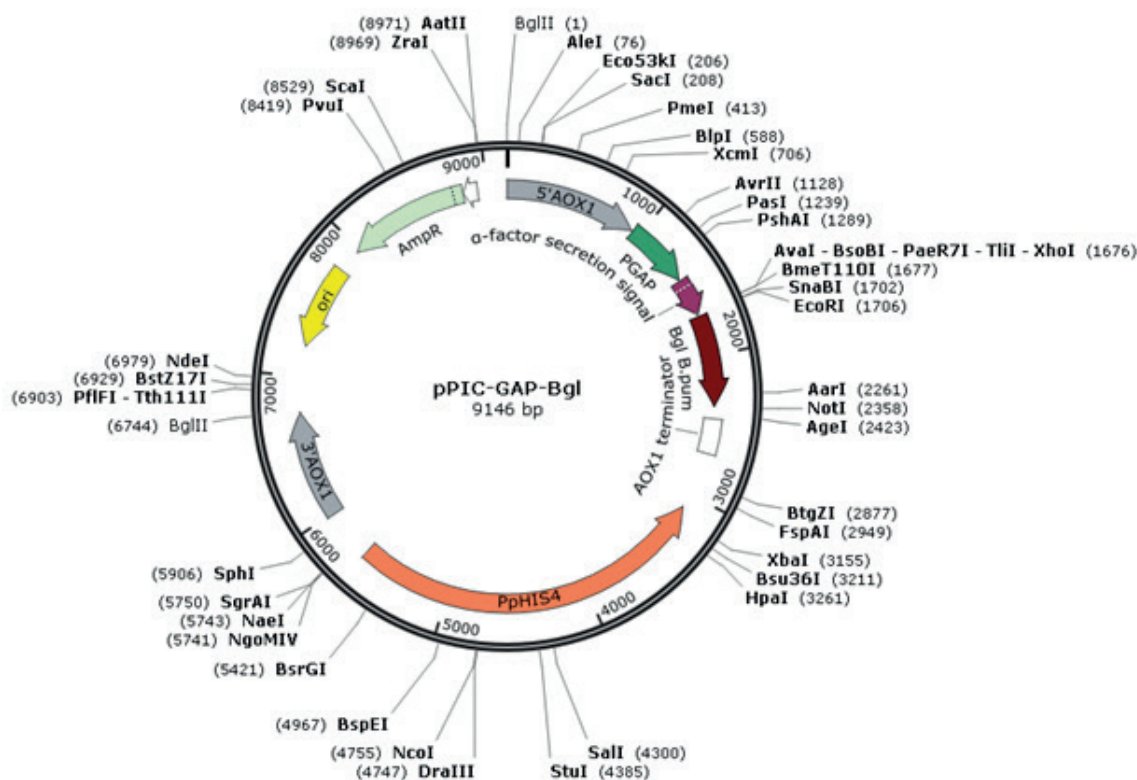


Рис. 3. Физическая карта экспрессионной плазмиды pPIC-GAP-Bgl

Fig. 3. Physical map of expression plasmid pPIC-GAP-Bgl

определен в 35 кДа, что больше, чем теоретически рассчитанный вес в 24,3 кДа, а белок был представлен в виде двойной полосы. Предположительно, это связано с посттрансляционными модификациями белка в дрожжевых клетках, вызванными гликозилированием. Как показал анализ аминокислотной последовательности, проведенный с использованием программы NetNGlyc 1.0 Server, в составе белка Bgl присутствуют три сайта N-гликозилирования Asn-X-Ser/Thr, где X означает любой аминокислотный остаток кроме пролина [30] (см. рис. 1).

Для N-дегликозилирования проводили обработку очищенного белка Bgl ферментом эндо- β -N-ацетилглюкозаминидазой H (endo-N).

SDS-PAGE-анализ показал, что после обработки endo-N белок был представлен в виде одной полосы, а его молекулярный вес составил 27 кДа, что также больше теоретически рассчитанного значения. Причиной этого могут быть O-гликозилирование или другие модификации, происходящие с белком в клетках *P. pastoris* (рис. 4).

На каждом этапе очистки белка проводили определение активности фермента в отношении β -глюкана ячменя. Результаты работы представлены в табл. 1.

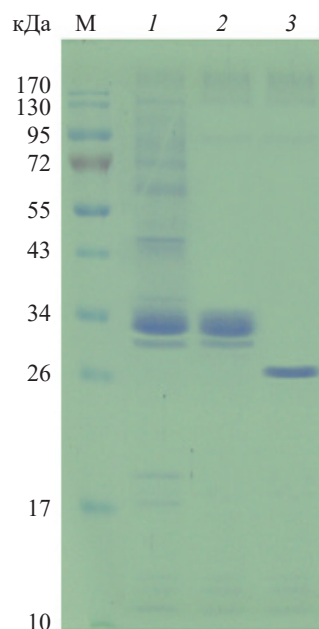


Рис. 4. SDS-PAGE-анализ белка Bgl. М – белковый маркер молекулярной массы; 1 – неочищенный Bgl; 2 – очищенный Bgl; 3 – дегликозилированный Bgl

Fig. 4. SDS-PAGE analysis of Bgl protein: M, standard protein molecular weight (Thermo Scientific); lane 1, unpurified Bgl protein; lane 2, purified Bgl protein; lane 3, the N-deglycosylated Bgl protein

Очистка рекомбинантного Bgl

Purification of recombinant Bgl

Стадия очистки	Объем (мл)	Концентрация белка (мг/мл)	Специфическая активность (ед/мг)	Степень очистки
Супернатант	50	0,576	385	1
Катионообменная хроматография на SP-сефарозе	3,3	0,033	4012	10,4

Очищенный рекомбинантный фермент Bgl показал высокую специфическую активность (4012 ед/мг белка). По этому показателю исследуемый белок уступает лишь наиболее активным бактериальным β -глюкозидам *Fibrobacter succinogenes* (10800 ед/мг белка) [31], *B. altitudinis* (5393 ед/мг белка) [32], *Paenibacillus* sp. F-40 (6001 ед/мг белка) [33].

Характеристики рекомбинантного Bgl были исследованы с использованием β -глюкана ячменя в качестве субстрата. Кинетические параметры K_m и V_{max} имели значения 2,2 мг/мл и 3036,4 мкмоль/мин·мг, соответственно.

Исследования показали, что pH-оптимум рекомбинантной β -глюкоказы Bgl равен 6 (рис. 5a). Фермент был активен при pH от 4 до 9 и сохранял более 50% активности при pH от 4,5 до 7,5. При pH ≤ 4 ферментативная активность не наблюдалась.

Изучение влияния температуры на активность Bgl показало, что температурный оптимум фермента равнялся 48–50 °С (рис. 5b), при этом активность выше 80% от максимального уровня сохраняется в диапазоне от 35 до 57 °С

Эффект pH на стабильность фермента анализировали инкубированием в буферах с различными pH при 37 °С 30 мин. Фермент был устойчив

в широком pH диапазоне, при этом более 80% активности сохранялось после обработки β -глюкоказы при pH 3–9 (рис. 5c).

Фермент был устойчив в условиях прогревания в течение 10 мин температурой 70, 80 и 90 °С – остаточная активность составила 50, 46 и 36%, соответственно (рис. 6a).

Белок Bgl был устойчив к пищеварительным ферментам. После обработки пепсином и трипсином в соответствующем буфере при 37 °С в течение 30 мин остаточная активность фермента составляла более 90%. (рис. 6b).

Была также исследована активность фермента в присутствии ионов металлов и химических реагентов (табл. 2). Активность была увеличена на 23,7% с Mn^{2+} и на 78,9% с Co^{2+} , уменьшена на 11,8% с K^+ , на 13,9% с ЭДТА, на 21,7% на СДС. Добавление других металлических ионов не имело эффекта или имело небольшой эффект на Bgl активность.

Специфическая активность очищенного фермента Bgl на различных субстратах была измерена при 50 °С pH 6 в течение 10 мин (табл. 3). В качестве субстратов были использованы полисахариды, мономеры которых соединены между собой β -1,3- или β -1,4- гликозидными связями.

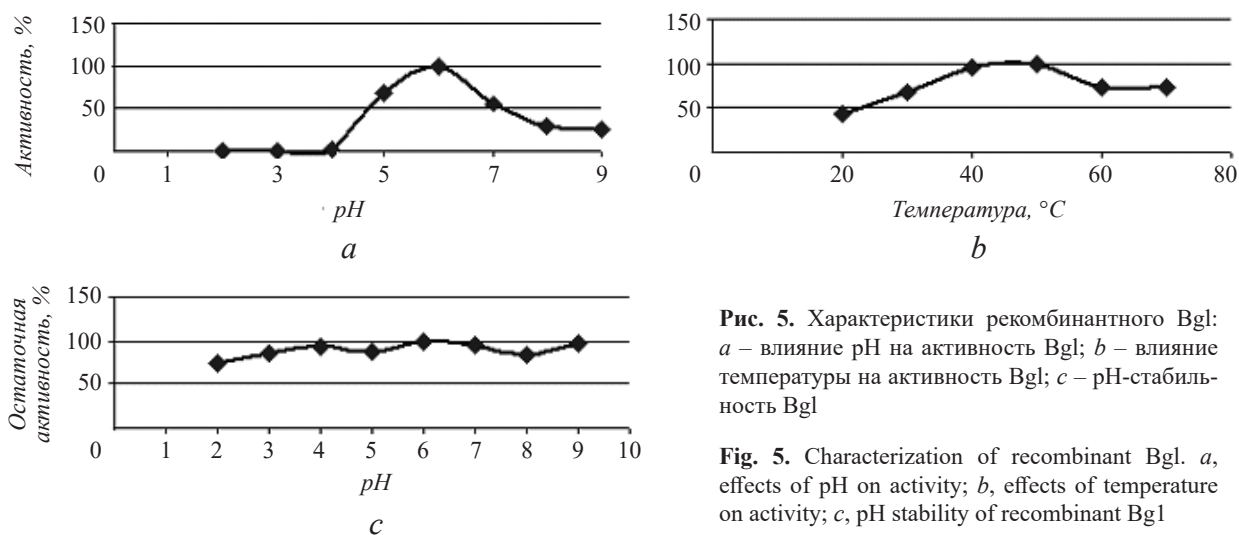


Рис. 5. Характеристики рекомбинантного Bgl: a – влияние pH на активность Bgl; b – влияние температуры на активность Bgl; c – pH-стабильность Bgl

Fig. 5. Characterization of recombinant Bgl. a, effects of pH on activity; b, effects of temperature on activity; c, pH stability of recombinant Bgl

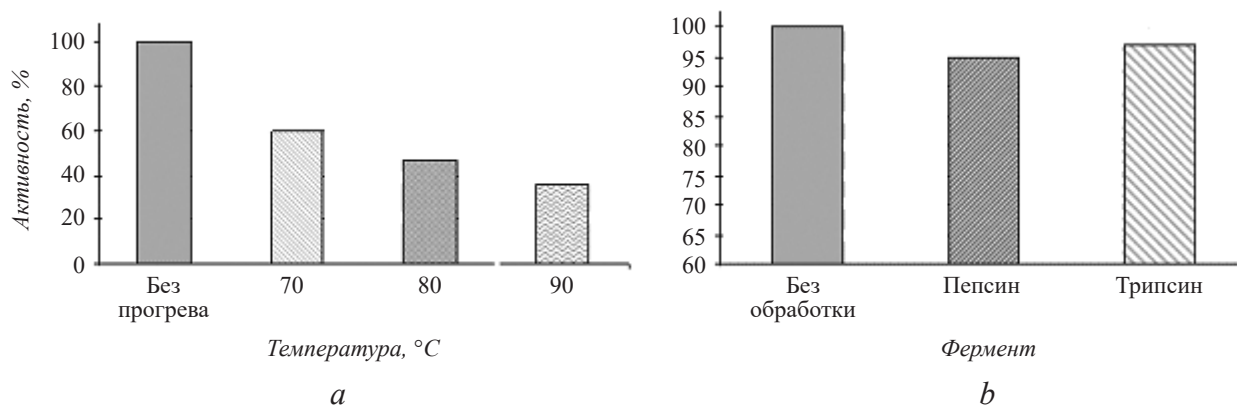


Рис. 6. Анализ термостабильности и устойчивости к пищеварительным ферментам: *a* – термостабильность BglI; *b* – устойчивость BglI к воздействию пепсина и трипсина

Fig. 6. Thermostability and resistance to digestive enzymes: *a*, thermostability of BglI; *b*, resistance of BglI to pepsin and trypsin

Рекомбинантный фермент BglI был способен гидролизировать β -1,3-1,4-связи в β -глюкане ячменя и лишенине, при этом целлюлоза и ксилан гидролизировались в очень малой степени (см. табл. 3).

Такая субстратная специфичность характерна для фермента эндо- β -1,3(4)-D-глюканазы. Однако специфическая активность исследуемого фермента на β -глюкане ячменя была в пять раз выше, чем на лишенине, что не характерно для фермента E.C. 3.2.1.73, называемого также лишениназой.

Как правило, для этого фермента характерна более высокая специфическая активность на лишенине, чем на β -глюкане ячменя в качестве субстрата [33]. Лишенин и β -глюкан ячменя являются линейными полисахаридами и состоят из остатков D-глюкозы, связанных между собой β -1,3- и β -1,4-гликозидными связями. Однако соотношение β -1,3- и β -1,4-связей в молекулах этих полисахаридов различается: если в составе молекулы лишенина 70% β -1,4-связей и 30% β -1,3-связей,

Таблица 2

Влияние солей металлов и химических реагентов на активность BglI

Effects of metal ions and chemical reagents on BglI activity

Ион металла, химический реагент	Активность, %	Ион металла, химический реагент	Активность, %
Na ⁺	91,4	Mn ²⁺	123,7
K ⁺	88,2	Co ²⁺	178,9
Mg ²⁺	101,3	Li ⁺	95,4
Ca ²⁺	94,1	Cu ²⁺	94,7
Fe ²⁺	94,7	ЭДТА	86,1
СДС	78,3	Ni ²⁺	99,3

Примечание: контроль – 100%.

Таблица 3

Субстратная специфичность очищенного фермента BglI

Substrate specificity of the purified BglI

Субстрат	Мономер	Активность фермента	
		ед/мг белка	%
β -глюкан ячменя	1,3-1,4- β -глюкоза	4012	100
Лишенин	1,3-1,4- β -глюкоза	805	20
КМЦ	1,4- β -глюкоза	39	0,98
Ксилан березы	1,4- β -ксилоза	42	1,05

то в молекулах β -глюкана ячменя это соотношение обратное – преобладают остатки глюкозы, связанные β -1,3-связями [34].

Исходя из результатов исследования, можно предположить, что Vgl способен гидролизовать как β -1,4-, так и β -1,3- связи, поэтому может быть отнесен к классу ферментов Е.С. 3.2.1.06.

Как показало сравнение аминокислотных последовательностей исследуемого белка и наиболее гомологичного ему фермента из *Bacillus licheniformis*, Vgl не имеет аминокислотных замен ни в области консервативного мотива (см. рис. 2, синяя рамка), ни в составе аминокислот активного центра (см. рис. 2, красная рамка), однако замены 73L/S, 83P/S, 84S/A, 96V/T присутствуют в субстрат-связывающей области (см. рис. 2, зеленая рамка) [35–38]. Возможно, что замены в данном регионе приводят к изменению конформации субстрат-связывающей области, влияют на связывание и удерживание субстрата ферментом и, как следствие, приводят к изменению субстратной специфичности.

Действительно, литературные данные свидетельствуют, что активность β -глюканазы *Bacillus licheniformis* на лишенине составляет 76% от активности на β -глюкане [39], в то время как Vgl на лишенине проявляет только 20% активности, по сравнению с β -глюканом.

Функции аминокислот в указанных выше положениях должны быть определены в дальнейших работах методом сайт-направленного мутагенеза.

Итак, исследуемый фермент имеет структуру, характерную для гликозилгидролаз семейства GH16, и наибольшую гомологию с β -глюканазой *Bacillus licheniformis*.

Подводя итоги настоящего исследования, можно с уверенностью говорить о новой высокоактивной секретлируемой β -глюканазе из *Bacillus pumilus* Vg57 ВКПМ В-13195 и ее свойствах: рекомбинантный белок обладает хорошими кинетическими характеристиками, высокой удельной активностью, превышающей 4000 ед/мг белка, высокой термостабильностью при кратковременном прогревании и устойчивостью к действию пищеварительных ферментов. Температурный оптимум исследуемого фермента составляет 48–50 °С, рН-оптимум – 6, при этом его активность сохраняется на высоком уровне в широком диапазоне рН и температур.

Все эти свойства делают перспективным использование исследуемого белка при создании на его основе дрожжевого рекомбинантного продуцента β -глюканазы для применения в кормопроизводстве или пивоварении.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта -RFMEFI60717X0179) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Parrish F. W., Perlin A. S., Reese E. T. Selective enzymolysis of poly- β -D-glucan, and the structure of the polymers. *Can. J. Chem.*, 1960, 38, 2094–2104.
2. Borriss R., Buettner K., Maentsaelae P. Structure of the beta-1,3-1,4-glucanase gene of *Bacillus macerans*: Homologies to other beta-glucanases. *Mol. Gen. Genet.*, 1990, 222, 278–283.
3. Anderson M. A., Stone B. A. A new substrate for investigating the specificity of β -glucan hydrolases. *FEBS Lett.*, 1975, 52, 202–207.
4. Hinchliff E., Wendy G. B. Expression of the cloned endo- β -1,3-1,4-glucanase gene of *Bacillus subtilis* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 1995, 8, 471–475.
5. Qiao J., Dong B., Li Y., et al. Cloning of a beta-1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus subtilis* MA139 and its functional expression in *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2009, 152, 334–342. doi: 10.1007/s12010-008-8193-4
6. Hoj P. B., Condron R., Traeger J. C., et al. Identification of glutamic acid 105 at the active site of *Bacillus amyloliquefaciens* 1,3-1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase using epoxide-based inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 25059–25066.
7. Teng D., Wang J., Fan Y., et al. Cloning of β -1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus licheniformis* EGW039 (CGMCC 0635) and its expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 72(4), 705–712. doi: 10.1007/s00253-006-0329-2
8. Lloberas J., Perez-Pons J. A., Querol E. Molecular cloning, expression and nucleotide sequence of the endo- β -1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus licheniformis*. *Eur. J. Biochem.*, 1991, 197, 337–343.
9. Borriss R., Buettner K., Maentsaelae P. Structure of the beta-1,3-1,4-glucanase gene of *Bacillus macerans*: Homologies to other beta-glucanases. *Mol. Gen. Genet.*, 1990, 222, 278–283.
10. Akita M., Kayatama K., Hatada Y., et al. A novel β -glucanase gene from *Bacillus halodurans* C-125. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, 248, 9–15. doi: 10.1016/j.femsle.2005.05.009
11. Mao S., Lu Z., Zhang C., Lu F. Purification, characterization, and heterologous expression of a thermostable β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus altitudinis* YC-9. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2013, 169(3), 960–975. doi: 10.1007/s12010-012-0064

12. Akita M., Kayatama K., Hatada Y., et al. A novel β -glucanase gene from *Bacillus halodurans* C-125. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, 248, 9–15. doi: 10.1016/j.femsle.2005.05.009
13. Schwarz W. H., Schimming S., Staudenbauer W. L. Isolation of a *Clostridium thermocellum* gene encoding a thermostable β -1,3-glucanase (laminarinase). *Biotechnol. Lett.*, 1988, 10, 225–230.
14. Ekinici M. S., McCrae S. I., Flint H. J. Isolation and overexpression of a gene encoding an extracellular β -(1,3-1,4)-glucanase from *Streptococcus bovis* JB1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63, 3752–3756.
15. Chen J. L., Tsai L. C., Wen T. N., et al. Directed mutagenesis of specific active site residues on *Fibrobacter succinogenes* 1,3-1,4-glucanase significantly affects catalysis and enzyme structural stability. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 17895–17901. doi: 10.1074/jbc.M100843200
16. Clark D. R., Johnson J., Chung K. H., Kirkwood S. Purification, characterization, and action-pattern studies on the endo-(1 linked to 3) β -D-glucanase from *Rhizopus arrhizus*. *Carbohydr. Res.*, 1978, 61, 457–477.
17. Sakellaris H., Pemberton J. M., Manners J. M. Characterization of an endo-1,3(4)- β -D-glucanase gene from *Cellvibrio mixtus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1993, 109, 269–272.
18. Spilliaert R., Hreggvidsson G. O., Kristjansson J. K., et al. Cloning and sequencing of a *Rhodothermus marinus* gene, bglA, coding for a thermostable β -glucanase and its expression in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 1994, 224, 923–930.
19. Gueguen Y., Voorhorst W. G. B., Van der Oost J., De Vos W. M. Molecular and biochemical characterization of an endo- β -1,3-glucanase of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 31258–31264.
20. Gorlach J. M., Van Der Knaap E., Walton J. D. Cloning and targeted disruption of MLG1, a gene encoding two of three extracellular mixed linked glucanases of *Cochilobolus carbonum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64, 385–391.
21. Bang M. L., Villadsen I., Sandal T. Cloning and characterization of an endo- β -1,3(4)-glucanase and an aspartic protease from *Phaffia rhodozyma* CBS 6938. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 51, 215–222.
22. Kawai R., Igarashi K., Yoshida M., et al. Hydrolysis of β -1,3/1,6-glucan by glycoside hydrolase family 16 endo-1,3(4)- β -glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 23, 1–9. doi: 10.1007/s00253-005-0214-4
23. Anderson M. A., Stone B. A. A new substrate for investigating the specificity of β -glucan hydrolases. *FEBS Lett.*, 1975, 52, 202–207.
24. Walsh G.A., Power F., Headon D.R. Enzymes in the animal-feed industry. *Trends Biotechnology*, 1993, 11(10), 424–430.
25. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 1959, 31 (3), 426–428.
26. Murphy N., McConnell D. J., Cantwell B.A. The DNA sequence of the gene and genetic control sites for the excreted *B. subtilis* enzyme beta-glucanase. *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12(13), 5355–5367.
27. Lloberas J., Perez-Pons J. A., Querol E. Molecular cloning, expression and nucleotide sequence of the endo-beta-1,3-1,4-D-glucanase gene from *Bacillus licheniformis*. Predictive structural analyses of the encoded polypeptide. *Eur. J. Biochem.*, 1991, 197(2), 337–343.
28. Yao W.L., Wang Y. S., Han J.G., et al. Purification and cloning of an antifungal protein from the rice diseases controlling bacterial strain *Paenibacillus polymyxa* WY110. *Yi Chuan Xue Bao – Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(9), 878–887.
29. Hahn M., Pons J., Planas A., et al. Crystal structure of *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase at 1.8 Å resolution. *FEBS Lett.*, 1995, 37, 4(2), 221–224.
30. Cereghino J. L., Cregg J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 2000, 24, 45–66.
31. Wen T., Chen J., Lee S., et al. A truncated *Fibrobacter succinogenes* 1,3-1,4-(3-d)-glucanase with improved enzymatic activity and thermotolerance. *Biochemistry*, 2005, 44, 9197–9205. doi: 10.1021/bi0500630
32. Mao S., Lu Z., Zhang C., et al. Purification, characterization, and heterologous expression of a thermostable β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus altitudinis* YC-9. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2013, 169(3), 960–975. doi: 10.1007/s12010-012-0064-3
33. Yang, Peilong, Pengjun S., et al. Cloning and overexpression of a *Paenibacillus* β -glucanase in *Pichia pastoris*: Purification and characterization of the recombinant enzyme. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 17(1), 58–66.
34. Johansson L. Structural analyses of (1→3), (1→4)- β -D-glucan of oats and barley. Academic Dissertation. University of Helsinki. Helsinki. 2006.
35. Varfolomeev S. D., Uporov I. V., Fedorov E. V. Review: Bioinformatics and molecular modeling in chemical enzymology. active sites of hydrolases. *Biochemistry* (Moscow), 2002, 67(10), 1099–1108.
36. Laura J., Kingsley, Markus A. L. Substrate Tunnels in enzymes: Structure-function relationships and computational methodology. *Proteins*, 2015, 83(4), 599–611. doi: 10.1002/prot.24772
37. Chakrabarti R., Klibanov A.M., Friesner R.A. Sequence optimization and designability of enzyme active sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2005, 102(34), 12035–12040. doi: 10.1073/pnas.0505397102

38. Keitel T., Simon O., Borri R., Heinemann U. Biochemistry molecular and active-site structure of a *Bacillus* 1,3-1,4- β -glucanase (hydrolase/inhibitor binding/protein conformation/x-ray crystallography/*in vitro* mutagenesis). *Natl. Acad. Sci.*, 1993, 90, 5287–5291.
39. Teng D., Wang J. H., Fan Y., et al. Cloning of beta-1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus licheniformis* EGW039 (CGMCC 0635) and its expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 72, 705–712. doi: 10.1007/s00253-006-0329-2

Cloning and Expression of *Bacillus pumilis* Bg57 β -Glucanase Gene in *Pichia pastoris*: Purification and Characteristics of Recombinant Enzyme

L.N. BORSHCHEVSKAYA^{1,*}, T.L. GORDEEVA¹, A.N. KALININA¹, N.V. BULUSHOVA¹, and S.P. SINEOKY¹

¹All-Russian Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center “Kurchatov Institute” (NRC “Kurchatov Institute” – GOSNIIGENETIKA), 117 545, Moscow Russia

*e-mail: larisa.larbor3@yandex.ru

Received June 20, 2018

Accepted August 30, 2018

Abstract—The isolation, heterologous gene expression and characteristics of a new β -glucanase from *Bacillus pumilis* has been described for the first time. A gene *bgl1* from the *Bacillus pumilis* Bg57 VKPM B-13195 consisting of 729 nucleotides encodes a secreted endo- β -1,3(4)-D-glucanase (EC 3.2.1.6) that contains 214 amino acids and 28 residues of the putative signal peptide in the N-terminal area. The nucleotide sequence of *bgl1* and amino acid sequence of the mature Bgl protein have the highest homology (89% and 95%, respectively) with the sequences for β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus licheniformis*. A fragment of the gene encoding the mature protein was expressed in *Pichia pastoris*. The purified recombinant enzyme of Bgl manifested the activity towards barley β -glucan and lichenine. Using barley β -glucan, the optimum pH and temperature was 6.0 and 50 °C, respectively; K_m and V_{max} were 2.2 mg/mL and 3036.4 μ mol/(min·mg), respectively. The recombinant protein Bgl showed high specific activity, thermal stability and resistance to digestive enzymes. Other characteristics of the recombinant protein including pH stability, and sensitivity to metal ions and chemical reagents were also determined.

Key words: enzymes, β -glucanase, yeast recombinant producers, *Pichia pastoris*.

Acknowledgements—The work was financially supported the state represented by the Ministry science and higher education of the Russian Federation—(unique project identifier - RFMEFI60717X0179), using the UNU – National bio-resource centre «All-Russian collection of industrial microorganisms» Research Center «Kurchatov Institute» GosNIIgenetika

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-5-12-22