

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 579.66

Сравнение свойств β -глюканаз *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens* в экспрессионной системе *Pichia pastoris*: биохимическая характеристика и потенциал для применения в кормопроизводстве

© 2018 Л.Н. БОРЩЕВСКАЯ^{1,*}, Т.Л. ГОРДЕЕВА¹, А.Н. КАЛИНИНА¹, А.С. ФЕДОРОВ¹, 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 12.10.2018 г.

После доработки 12.11.2018 г.

Принята в печать 15.12. 2018 г.

В экспрессионной системе *Pichia pastoris* проведено сравнение четырех бактериальных эндо- β -1,3(4)-D-глюканаз из *Bacillus pumilus* Bg57 ВКПМ В-13195, *Paenibacillus polymyxa* Bg23 ВКПМ В-4056, *Bacillus subtilis* Bg11 ВКПМ В-13178 и *B. amyloliquefaciens* Bg76 ВКПМ В-13184, относящихся к семейству GH16 гликозилгидролаз. Были исследованы такие технологически значимые характеристики рекомбинантных β -глюканаз, как удельная активность, рН- и термостабильность, температурный и рН оптимумы, устойчивость к пищеварительным ферментам, субстратная специфичность. Было показано, что для создания продуцента β -глюканаз на основе рекомбинантных штаммов дрожжей *P. pastoris* с целью использования его в кормопроизводстве наибольшим биотехнологическим потенциалом обладают ферменты из *B. pumilus* и *P. polymyxa*.

Ключевые слова: β -глюканаза, β -глюкан, *Pichia pastoris*.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-12-21

Основной компонент клеточной стенки эндосперма ячменя, ржи, риса и пшеницы – β -глюканы – являются линейными полисахаридами, содержащими как β -1,3-, так и β -1,4-связанные мономеры D-глюкозы [1].

β -глюканы, наряду с пентозами, пектином и целлюлозой, относятся к нерастворимым полисахаридам, входящим в состав растительных кормов сельскохозяйственных животных, высокое содержание которых приводит к нарушению процессов пищеварения из-за недоступности питательных веществ для пищеварительных фермен-

тов, а также к изменению перистальтики и водного режима кишечника.

Для эффективного снижения негативного влияния β -глюкана в комбикорма вводят ферментные препараты β -глюканаз, которые способствуют усвояемости обменной энергии и аминокислот, а также улучшают продуктивность и конверсию корма [2].

Для кормопроизводства наиболее востребованы β -глюканазы, способные расщеплять внутренние 1,4/1,3- β -глюкозидные связи между остатками глюкозы в β -глюканах. К таким ферментам относятся:

Список сокращений: КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; LB среда – среда Luria Bertani; YPD-среда – Yeast Extract–Peptone–Dextrose Medium; DNS (ДНС)-метод – метод определения ферментативной активности β -глюканазы с использованием ДНС-реактива; SDS (СДС) – лаурилсульфат натрия.

– 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, способный эндогенно катализировать гидролитическое расщепление внутренних β -1,3- или β -1,4-связей в β -глюканах, у которых глюкозный остаток замещен в положении C₃ [3];

– 1,3-1,4- β -D-Глюкан-4-глюканогидролаза (Е.С. 3.2.1.73), рабочее название – лихеназа; гидролизует 1,4- β -глюкозидные связи в β -D-глюканах, имеющих 1,3- и 1,4-связи [4]

Свойства ферментов, используемых в кормопроизводстве, должны соответствовать требованиям технологии приготовления кормов и отвечать особенностям физиологии пищеварения животных: 1) наличие высокой термостабильности у ферментов, входящих в состав кормовых препаратов, диктуется необходимостью гранулирования. Процесс гранулирования осуществляется при температуре 80 °С в течение 5–10 мин, следовательно, кормовые ферменты должны быть стабильны и не терять активности при указанных условиях; 2) рН-стабильность связана с тем, что при продвижении по ЖКТ съеденного животным корма рН изменяется от 2,0 в желудке до 8,0 в кишечнике; 3) наличие рН-оптимума, близкого к физиологическому значению рН содержимого кишечника (от 4 до 7) [5–10]; 4) фермент не должен подвергаться воздействию пищеварительных ферментов и денатурировать в момент смешения съеденного животным корма с желудочным соком, когда рН принимает кислые значения [11–15]; 5) соответствие температурного оптимума ферментов температуре тела животного; 6) ферменты, применяемые в кормопроизводстве, должны обладать высокой удельной активностью.

Природными источниками β -глюканаз являются микроорганизмы (грибы и бактерии).

Ферменты различного происхождения различаются по субстратной специфичности, удельной активности, оптимуму рН и температуры, и по термостабильности. β -глюканазы грибного происхождения характеризуются, как правило, кислым оптимумом рН и высоким температурным оптимумом [16–18]. β -глюканазы бактериального происхождения имеют оптимум рН, лежащий в нейтральной или слабощелочной области, отличаются высокой термостабильностью и высокой удельной активностью [19–23]

Большинство кормовых ферментных препаратов, используемых в настоящее время, имеют грибное происхождение, тогда как дрожжи более удобны для проведения генно-инженерных работ и быстрее накапливают целевой фермент в сравне-

нии с грибными продуцентами. На основе дрожжевых продуцентов значительно легче создавать продуценты моноферментов, тогда как грибные продуценты обычно синтезируют комплексы целлюлолитических ферментов. Промышленное получение моноферментов позволяет более эффективно решать задачи составления оптимальной композиции ферментов при использовании различных субстратов. Так что разработка рекомбинантных продуцентов ферментов на основе дрожжей представляет большой интерес с научной и технологической точки зрения.

Сегодня наиболее перспективным является создание продуцентов на основе рекомбинантных штаммов метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. Дрожжи *P. pastoris* способны вырастать до очень высоких плотностей с использованием несбраживаемых источников углерода (глицерин, метанол), что позволяет получать высокие уровни гетерологического белка [24]. При этом процесс культивирования метилотрофных дрожжей достаточно прост, поскольку их рост не блокируется продуктами метаболизма [25]

Однако белки, в том числе и ферменты, синтезируемые в *P. pastoris*, подвергаются посттрансляционным модификациям, что может приводить к существенному изменению их свойств. Кроме того, эффективность выражения белков различного происхождения в клетках метилотрофных дрожжей может быть различной. Эти аспекты необходимо учитывать на стадии планирования работ по созданию рекомбинантных штаммов-продуцентов.

Цель настоящей работы состоит в выборе ферментов β -глюканаз, перспективных для создания на их основе рекомбинантных дрожжевых продуцентов, способных эффективно экспрессироваться в клетках дрожжей *P. pastoris* и обладающих свойствами, оптимальными для использования в кормопроизводстве в качестве добавки к комбикормам на основе злаков.

В ходе работы предполагается сравнить наиболее значимые с технологической точки зрения свойства исследуемых ферментов: удельную активность, субстратную специфичность, термостабильность, температурный и рН-оптимум, устойчивость к различным значениям рН, устойчивость к протеолитическим ферментам.

Результаты данной работы дадут возможность определить ферменты с оптимальными свойствами для создания на их основе рекомбинантного дрожжевого продуцента β -глюканазы.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Микроорганизмы, питательные среды, плазмиды

Для решения поставленной задачи исследованы четыре бактериальные β -глюканазы в экспрессионной системе *P. pastoris*: из штаммов *B. subtilis* Bg11 ВКПМ В-13178, *B. amyloliquefaciens* Bg76 ВКПМ В-13184, *B. pumilus* Bg57 ВКПМ В-13195 и *P. polymyxa* Bg23 ВКПМ В-4056. Штаммы были выделены в результате скрининга из образцов лесной почвы Московской обл. и депонированы в ВКПМ.

Для клонирования был использован штамм *Escherichia coli* XL1 Blue (*endA1 supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac hsdR17 F'*[proAB lacIqZAM15 Tn10]) ВКПМ В-9838

Для экспрессии в дрожжах был использован штамм *P. pastoris* ВКПМ Y- 2837 (His-) и вектор pPIC-GAP ВКПМ В-10978.

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

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей были использованы программы 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 поиска сайтов N-гликозилирования была использована программа NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Конструирование рекомбинантных экспрессионных плазмид

Суммарную ДНК штаммов *B. subtilis* Bg11 ВКПМ В-13178, *B. amyloliquefaciens* Bg76 ВКПМ В-13184, *B. pumilus* Bg57 ВКПМ В-13195 и *P. polymyxa* Bg23 ВКПМ В-4056 выделяли, используя набора для выделения ДНК, S-Сорб («Синтол», Россия).

Аmplификацию генов, кодирующих β -глюканазы, проводили с помощью праймеров (табл. 1).

Аmplифицированные продукты, кодирующие зрелые ферменты β -глюканазы, были клонированы в состав вектора pPIC-GAP, в результате чего были получены рекомбинантные плазмиды pPIC-GAP-BgPum, pPIC-GAP-BgPaen, pPIC-GAP-BgSub, pPIC-GAP-BgAmy. Последовательности, кодирующие ферменты, были встроены в рамку считывания с сигнальной последовательностью вектора.

Получение трансформантов и ферментация отобранных штаммов *P. pastoris*

Плазмиды pPIC-GAP-BgPum, pPIC-GAP-BgPaen, pPIC-GAP-BgSub, pPIC-GAP-BgAmy были линейаризованы с использованием рестриктазы BglII, трансформированы и интегрированы в клетки штамма *P. pastoris* ВКПМ Y- 2837 методом электропорации (http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf). Экспрессионные кассеты были встроены в АОХ1 locus посредством гомологической рекомбинации.

Трансформанты выращивали в среде YPD в течение 20 ч при 30 °С и аэрации 250 об/мин.

Таблица 1

Праймеры, использованные для амплификации генов β -глюканаз

Primers used for amplification of β -glucanase genes

Микроорганизм	Праймер	Последовательность
<i>Bacillus pumilus</i>	BgPum-f	5'-aagaattccaacggcggtctttatga-3'
	BgPum-r	5'-aagcgccgcttatcttttggtaacgca-3'
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	BgPaen-f	5'-aagaattcgcggggaatgttttgggaa-3'
	BgPaen-r	5'-aagcgccgcctaattgctcgtgtattttac-3'
<i>Bacillus subtilis</i>	BgSub-f	5'-aagaattccaacaggtggatcgtttt-3'
	BgSub-r	5'-aagcgccgcttatttttgtataacgca-3'
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	BgAmy-f	5'-aagaattccatacaggtggatcgtaat-3'
	BgAmy-r	5'-aagcgccgcttatttgggtgtataaccgc-3'

Клетки пересеивали в пробирки со средой YPD в соотношении 1:10, растили в течение 4 сут с той же аэрацией при 30 °С. Через каждые 24 ч добавляли 2% глюкозы.

Ферментацию штаммов-продуцентов PpBgPum, PpBgPaen, PpBgSub, PpBgAmy проводили в среде YPD в колбах 500 мл в течение 72 ч. Образцы объемом 1 мл отбирали каждые 24 ч. После окончания ферментации определяли активность ферментов в культуральной жидкости.

Анализ ферментативной активности

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

Редуцированные сахара определяли DNS-методом с использованием глюкозы в качестве стандарта [26].

Одна единица активности фермента соответствовала количеству фермента, требуемого для образования 1 мкМ редуцированных сахаров за 1 мин.

Изучение свойств рекомбинантных β -глюканаз

Оптимум рН устанавливали, инкубируя рекомбинантный белок с использованием в качестве субстрата β -глюкана ячменя в буферах: 0,5 М глициновый (рН 2, рН 3), 0,5 М ацетатный (рН 4–8), 0,5 М трис-буфер (рН 9).

Влияние рН на стабильность ферментов оценивали инкубированием в тех же буферных системах с рН от 2 до 9 при 37 °С 30 мин. с последующим измерением их специфической активности.

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

Проводя стандартное исследование активности ферментов в диапазоне температур 20–70 °С устанавливали температурный оптимум.

Для определения термостабильности стандартным методом измеряли остаточную активность ферментов после инкубации в течение 10 мин при каждом из значений температуры – 70, 80, и 90 °С.

По активности β -глюканаз на различных субстратах (β -глюкан ячменя (Megazym, США), лихенин (Serva, Германия), карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) («Химмед») и ксилан березы (Sigma, США)) была выявлена субстратная специфичность ферментов.

Устойчивость к протеолитическим ферментам

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

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. Окрашивание белковых гелей осуществляли 0,1%-ным раствором Кумасси голубой R250.

Очистка рекомбинантных β -глюканаз

Очистку белков проводили с использованием колонок Microcon YM-50 (Millipore, Ирландия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Из литературных источников известно, что β -глюканазы *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus* являются секретируемыми эндо- β -1,3(4)-*D*-глюканазами, относящимися к семейству GH16. Некоторые свойства β -глюканаз из этих видов микроорганизмов изучены и охарактеризованы [23, 27–30], однако, сравнение свойств этих ферментов в одной экспрессионной системе ранее не проводилось.

β -глюканаза из *P. polymyxa* ранее не была охарактеризована. Этот фермент впервые был исследован в ходе данной работы.

Экспрессия и ферментация рекомбинантных β -глюканаз в *P. pastoris*

Для сравнения эффективности экспрессии генов, кодирующих β -глюканазы различного происхождения в клетках дрожжей *P. pastoris*, был использован экспрессионный интегративный вектор pPIC-GAP. В состав экспрессионной кассеты вектора входит GAP-промотор гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *P. pastoris*, обеспечивающий высокоуровневую конститутивную экспрессию гетерологических генов, и сигнальная последовательность α -фактора *Saccharomyces cerevisiae* для эффективной секреции белков. Экспрессионная кассета фланкирована нуклеотидными последовательностями, длина

которых позволяет осуществлять преимущественно однокопийное встраивание в локус гена АОХ1 *P. pastoris* за счет механизма гомологичной рекомбинации [31].

Фрагменты ДНК, кодирующие зрелые области β -глюканаз из *B. subtilis* Bg11 ВКПМ В-13178, *B. amyloliquefaciens* Bg76 ВКПМ В-13184, *B. pumilus* Bg57 ВКПМ В-13195 были наработаны методом полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров (табл. 1), и клонированы в состав экспрессионного вектора рPIC-GAP.

Несмотря на то, что β -глюканазы *P. polymyxa* не были охарактеризованы, однако на основании секвенированных геномов штаммов этого вида были предсказаны гены, кодирующие эти ферменты. Были проанализированы доступные последовательности генов *P. polymyxa*, предположительно кодирующие β -глюканазы, выбраны консервативные участки и на их основании сконструированы праймеры BgPaen-f и BgPaen-r для амплификации гена β -глюканазы (табл. 1). Амплифицированный фрагмент ДНК, кодирующий зрелую область фермента, был также клонирован в состав экспрессионного вектора рPIC-GAP.

Таким образом, были сконструированы экспрессионные плазмиды рPIC-GAP-BgSub, рPIC-GAP-BgAmy, рPIC-GAP-BgPum и рPIC-GAP-Bg-

Paen, в состав которых входили гены β -1,3(4)-глюканаз *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* и *P. polymyxa* соответственно.

Экспрессионные плазмиды были линейаризованы и трансформированы в клетки *P. pastoris*. Для дальнейших исследований были отобраны клоны, в которых экспрессионные кассеты были интегрированы в локус АОХ1. Отобранные штаммы были названы PBgSub, PBgAmy, PBgPum и PBgPaen.

Ферментация отобранных штаммов проводилась в течение 72 ч в среде YPD в 500 мл колбах с добавлением через каждые 24 ч культивирования 2% глюкозы.

β -глюканазная активность в культуральной жидкости к концу ферментации для PBgPum достигала 280 ед/мл, для PBgPaen – 220 ед/мл, для PBgSub – 6,3 ед/мл и для PBgAmy – 11,8 ед/мл.

Анализ рекомбинантных белков

Исследование рекомбинантных β -глюканаз проводили методом SDS-PAGE электрофореза (рис. 1). В качестве образцов использовали супернатант культуральных жидкостей, содержащих секретируемые белки.

На рис. 1 видно, что концентрация β -глюканаз различного происхождения в исследуемых культуральных жидкостях различается. Так, самая большая концентрация наблюдается для рекомбинантной β -глюканазы из *B. pumilus*, в то время как концентрация белков из *P. polymyxa*, *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* была несколько ниже.

Это может свидетельствовать как о различной эффективности экспрессии рекомбинантных генов β -глюканаз, так и о различной эффективности секреции белков.

В табл. 2 показано, что фактическая молекулярная масса секретируемой рекомбинанткой β -глюканазы (рис. 1) больше теоретически рассчитанных значений.

Вероятно, это связано с гликозилированием рекомбинантных белков. Анализ с использованием программы NetNGlyc 1.0 Server показал, что в составе аминокислотных последовательностей зрелых β -глюканаз из *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* и *P. polymyxa* присутствуют 3 сайта N-гликозилирования, а из *B. subtilis* – 4 сайта.

Удельную активность определяли для частично очищенных белков при оптимальных для каждого фермента условиях с использованием β -глюкана ячменя в качестве субстрата. Концентрацию белка определяли методом Бредфорда.

Наибольшая удельная активность наблюдалась для β -глюканазы из *P. polymyxa* – 1864 ед/мг белка.

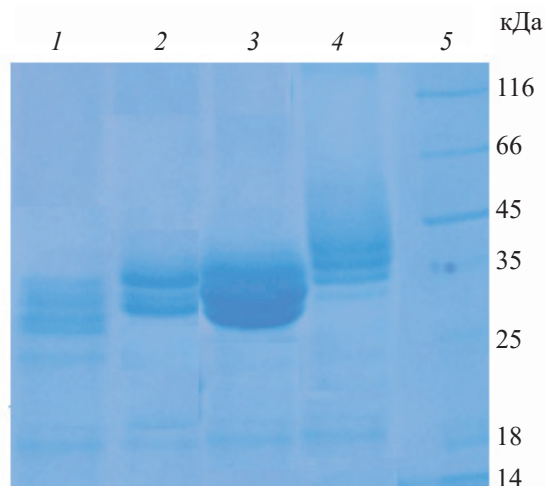


Рис. 1. SDS-PAGE-анализ рекомбинантных β -глюканаз из: 1 – *B. amyloliquefaciens* (BgAmy); 2 – *B. subtilis* (BgSub); 3 – *B. pumilus* (BgPum); 4 – *P. polymyxa* (BgPaen); 5 – белковый маркер молекулярной массы

Fig. 1. SDS-PAGE analysis of recombinant β -glucanases from: 1 – *B. amyloliquefaciens* (BgAmy); 2 – *B. subtilis* (BgSub); 3 – *B. pumilus* (BgPum); 4 – *P. polymyxa* (BgPaen); 5 – standard protein molecular weight (Thermo Scientific)

Характеристики рекомбинантных β -глюкоаназ

Characteristics of recombinant β -glucanases

Фермент	Удельная активность, ед/мг белка	Молекулярная масса, кДа	
		фактическая	рассчитанная
BgPum	1458	30	24,3
BgPaen	1864	35	24,1
BgSub	59	30	24,3
BgAmy	83	26	24,2

Характеристика рекомбинантных β -глюкоаназ

Характеристики рекомбинантных β -глюкоаназ были исследованы в культуральных жидкостях с использованием β -глюкана ячменя в качестве субстрата.

pH-оптимум. Результаты исследований активности рекомбинантных ферментов от значений pH показаны на рис. 2.

Установлено, что pH-оптимум рекомбинантной β -глюкоаназы из *B. pumilus* равен 6. 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 и ниже ферментативной активности не наблюдалось.

pH-оптимум рекомбинантной β -глюкоаназы из *P. polymyxa* был равен 5,7, проявляя активность в диапазоне pH от 3 до 9 и сохраняя более 50% активности при pH от 4,2 до 7,8. При pH <3 фермент был не активен.

pH-оптимум рекомбинантной ксиланазы из *B. subtilis* равен 6. Фермент был активен в диапазоне pH от 2 до 9, сохраняя 50% активности при pH от 5 до 7.

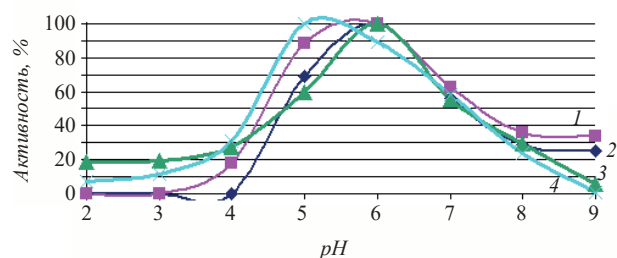


Рис. 2. Активность рекомбинантных β -глюкоаназ при различных значениях pH. 1 – *P. polymyxa* (BgPaen); 2 – *B. pumilus* (BgPum); 3 – *B. subtilis* (BgSub); 4 – *B. amyloliquefaciens* (BgAmy)

Fig. 2. The activity of recombinant β -glucanase at different pH. (1), *P. polymyxa* (BgPaen); (2), *B. pumilus* (BgPum); (3), *B. subtilis* (BgSub); and (4), *B. amyloliquefaciens* (BgAmy)

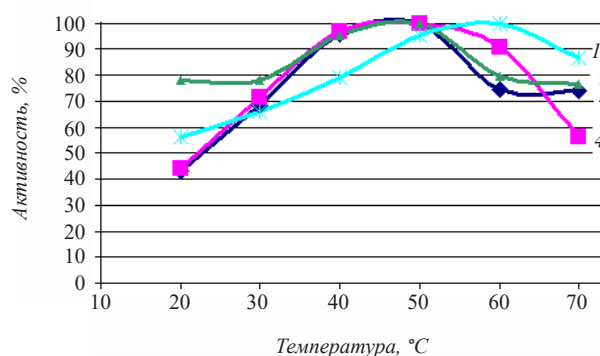


Рис. 3. Активности рекомбинантных β -глюкоаназ в диапазоне температур. 1 – *B. amyloliquefaciens* (BgAmy); 2 – *B. subtilis* (BgSub); 3 – *B. pumilus* (BgPum); 4 – *P. polymyxa* (BgPaen)

Fig. 3. Activity of recombinant β -glucanases in a temperature range (1), *B. amyloliquefaciens* (BgAmy); (2), *B. subtilis* (BgSub); (3), *B. pumilus* (BgPum); and (4), *P. polymyxa* (BgPaen)

pH-оптимум рекомбинантной ксиланазы из *B. amyloliquefaciens* равен 5. Фермент был активен в диапазоне pH от 2 до 9, сохраняя 50% активности в диапазоне pH от 4 до 7,5.

Таким образом pH оптимумы всех исследованных β -глюкоаназ находятся в диапазоне pH от 4 до 7, что соответствует технологическим требованиям, необходимым для использования их в качестве кормовых ферментов.

Температурный оптимум. Определение оптимальных температур работы рекомбинантных β -глюкоаназ проводили в диапазоне от 20 до 70 °C (рис. 3)

Температурный оптимум β -глюкоаназы из *B. pumilus* был установлен на 48 °C, фермент сохранял активность выше 80% от максимального уровня в диапазоне от 35 до 57 °C.

Температурный оптимум ксиланазы из *P. polymyxa* лежал в диапазоне от 43 до 57 °C. Уровень активности фермента выше 80% сохраняется в диапазоне от 32 до 65 °C.

Температурный оптимум β-глюканазы из *B. subtilis* равняется 48 °С, фермент сохраняет активность выше 80% в диапазоне от 30 до 60 °С.

Температурный оптимум ксиланазы из *B. amyloliquefaciens* лежит в диапазоне 55–60 °С. Уровень активности фермента выше 80% сохраняется в диапазоне от 40 до 70 °С.

Исследования показали, что наиболее оптимальными свойствами обладают рекомбинантные β-глюканазы из *B. pumilus*, *P. polymyxa* и *B. subtilis*, специфическая активность которых при оптимальных для кормопроизводства температурах, близких к температуре тела сельскохозяйственных животных, составляет 85–100%, в то время как этот показатель для рекомбинантной β-глюканазы из *B. amyloliquefaciens* не превышает 80%.

рН-стабильность

Эффект рН на стабильность ферментов был изучен инкубированием исследуемых β-глюканаз в буферах с различными рН с последующим измерением остаточной активности (рис. 4).

Как видно из данных, представленных на рис. 4, рекомбинантные β-глюканазы из *B. pumilus* и *P. polymyxa* стабильны в диапазоне рН от 3 до 9. При рН 2 ферменты показали незначительное снижение активности.

Рекомбинантные ферменты из *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* были нестабильны при рН ниже 3 и выше 7.

Таким образом, только ферменты из *B. pumilus* и *P. polymyxa* показали высокие уровни рН стабильности, что позволяет их использование в кормопроизводстве.

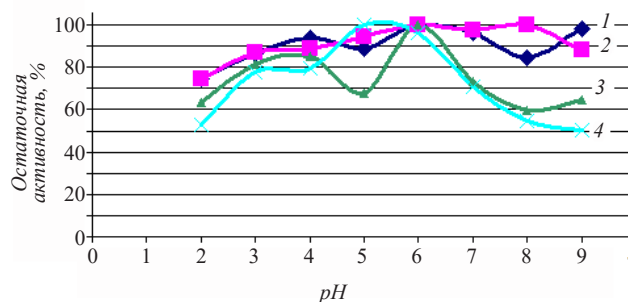


Рис. 4. Стабильность рекомбинантных β-глюканаз при различных значениях рН. 1 – *B. pumilus* (BgPum); 2 – *P. polymyxa* (BgPaen); 3 – *B. subtilis* (BgSub); 4 – *B. amyloliquefaciens* (BgAmy)

Fig. 4. pH-Stability of recombinant β-glucanases from: (1), *B. pumilus* (BgPum); (2), *P. polymyxa* (BgPaen); (3), *B. subtilis* (BgSub); and (4), *B. amyloliquefaciens* (BgAmy)

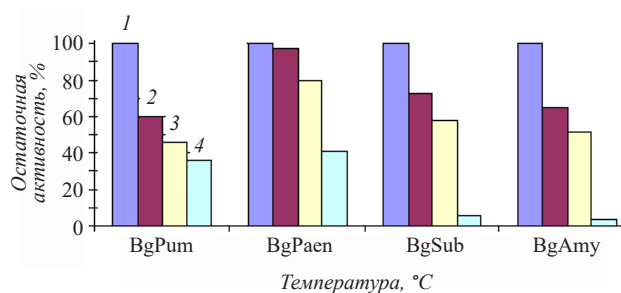


Рис. 5. Результаты исследований термостабильности рекомбинантных β-глюканаз. 1 – контроль без прогрева; 2 – при нагревании до 70 °С; 3 – при 80 °С; 4 – при 90 °С

Fig. 5. Thermal stability of recombinant β-glucanases, when heated to 70 °C (2), 80 °C (3) and 90 °C (4). 1 – control without heating

Термостабильность

Результаты исследований термостабильности рекомбинантные β-глюканаз показаны на рис. 5.

Исследования показали, что рекомбинантная ксиланаза из *B. pumilus* обладает умеренной термостабильностью, остаточная активность этого фермента составила 60, 48 и 38% после инкубирования при 70, 80 и 90 °С, соответственно, рекомбинантная β-глюканаза из *P. polymyxa* показала высокую термостабильность – 98, 80 и 40% соответственно, рекомбинантные ферменты из *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* показали умеренную термостабильность – 72% и 65% (при 70 °С) и 51% и 59% при 80 °С, соответственно, однако прогревание при 90 °С привело к снижению их активности до 5% и 2%, соответственно.

Устойчивость к пищеварительным ферментам

Результаты исследований эффекта устойчивости к протеолитическим ферментам показаны на рис. 6.

Как видно из данных, представленных на рис. 6, β-глюканазы из *B. pumilus* и *P. polymyxa* показали высокую устойчивость к действию пищеварительных протеаз. Рекомбинантные ферменты из *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* были устойчивы к действию трипсина, но чувствительны к действию пепсина.

Изучение субстратной специфичности рекомбинантных ксиланаз

Сравнение специфической активности рекомбинантных β-глюканаз проводили с использованием следующих субстратов: β-глюкан ячменя,

СРАВНЕНИЕ СВОЙСТВ β -ГЛЮКАНАЗ

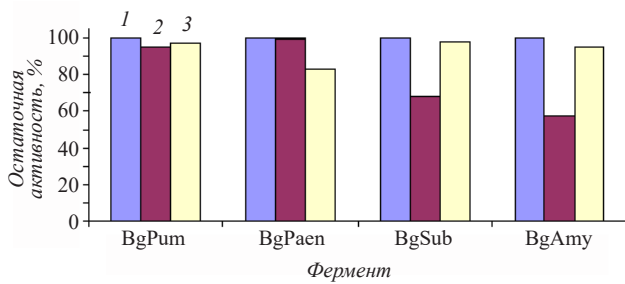


Рис. 6. Устойчивость рекомбинантных β -глюканаз к пищеварительным ферментам. 1 – контроль без воздействия пищеварительных ферментов; 2 – трипсин; 3 – пепсин

Fig. 6. Resistance of recombinant β -glucanases to digestive enzymes: (1), control (without digestive enzymes); (2), effect of trypsin; and (3), effect of pepsin

лихенин, карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) и ксилан березы.

Все исследованные рекомбинантные ксиланазы показали самую большую специфичность при использовании в качестве субстрата β -глюкана ячменя (табл. 3). Специфичность к лишайнику – растворимому β -глюкану из лишайника *Cetraria islandica* – была ниже (от 74,6% максимального уровня для фермента из *B. amyloliquefaciens* до 19,9% для фермента из *P. polymyxa*). Ксилан березы и целлюлоза гидролизировались в гораздо меньшей степени.

Способность к эффективному гидролизу β -глюкана ячменя является важной характеристикой при выборе фермента, так как именно этот и подобные ему полисахариды злаков являются основными субстратами кормовых β -глюканаз.

Итак, в ходе работы проведено сравнение β -глюканаз различного происхождения в единой экспрессионной системе *P. pastoris* с соблюдением условий одинакового места интеграции и копийности экспрессионной кассеты в составе хромосомы штамма-хозяина с целью отбора белка,

имеющего оптимальные свойства для применения в кормопроизводстве при создании на его основе рекомбинантного дрожжевого продуцента.

Исследования рекомбинантных β -глюканаз из *B. pumilus* Bg57 ВКПМ В-13195 (BgPum) и *P. polymyxa* Bg23 ВКПМ В-4056 (BgPaen) показали, что дрожжевые штаммы, созданные на основе этих ферментов, являются продуктивными, гены, кодирующие ферменты, способны эффективно экспрессироваться в клетках дрожжей, в процессе ферментации белки эффективно секретируются в культуральную жидкость, имеют высокую удельную активность, проявляют высокую рН стабильность и высокую устойчивость к пищеварительным ферментам. Кроме того, рабочий диапазон рН и температур ферментов, их высокая термостабильность и способность к эффективному гидролизу β -глюкана ячменя соответствуют технологическим требованиям, предъявляемым к β -глюканазам, используемым в качестве кормовых добавок к комбикормам сельскохозяйственных животных. Ферменты могут быть использованы для создания на их основе рекомбинантных дрожжевых штаммов-продуцентов β -глюканазы, используемых для кормопроизводства.

Исследования рекомбинантных β -глюканаз из *B. subtilis* Bg11 ВКПМ В-13178 (BgSub) и *B. amyloliquefaciens* Bg76 ВКПМ В-13184 (BgAmy) показали, что гены, кодирующие ферменты, способны эффективно экспрессироваться в клетках дрожжей, в процессе ферментации белки эффективно секретируются в культуральную жидкость. Рабочий диапазон рН и температур ферментов, способность к эффективному гидролизу β -глюкана ячменя соответствуют требованиям пищевых добавок для сельскохозяйственных животных. Однако низкие удельная активность, рН- и термостабильность, недостаточная устойчивость к пищеварительному ферменту пепсину делают нецелесообразным использование данных ферментов для создания на их основе рекомбинантных дрожжевых штаммов-продуцентов.

Таблица 3

Субстратная специфичность рекомбинантных β -глюканаз

Substrate specificity of recombinant β -glucanases

Фермент	Активность, %			
	β -глюкан ячменя	Лихенин	КМЦ	Ксилан березы
BgPum	100	42,6	0,98	1,1
BgPaen	100	19,9	5,1	5,5
BgSub	100	60,4	1,7	0,9
BgAmy	100	74,6	0,7	1,2

Таким образом, проведенные исследования позволили нам отобрать оптимальные ферменты – β -глюканазы из *B. pumilus* и *P. polytuxa*, обладающие необходимыми свойствами для использования их в качестве кормовой добавки и для эффективной экспрессии в клетках дрожжей *P. pastoris*.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI60717X0179) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Second Edition. Fargo, USA. Academic Press., 2003. doi: 10.1016/B0-12-227055-X/00012-2
2. Ribeiro T., Lordelo M.M.S., Ponte P.I.P., et al. Levels of endogenous β -glucanase activity in barley affect the efficacy of exogenous enzymes used to supplement barley-based diets for poultry. *Poultry Science Association Inc.*, 2011, 1245–1256. doi: 10.3382/ps.2010-01218
3. 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.
4. Anderson M.A., Stone B.A. A new substrate for investigating the specificity of β -glucan hydrolases. *FEBS Lett.*, 1975, 52, 202–207.
5. Steinfeldt S. The dietary effect of different wheat cultivars for broiler chickens. *British Poultry Science*, 2001, 42, 595–609, doi: 10.1080/00071660120088416
6. Gonzales-Alvarado J.M., Jimenez-Moreno E., Valencia D.G., et al. Effects of fiber source and heat processing of the cereal on the development and pH of the gastrointestinal tract of broilers fed diets based on corn or rice. *Poultry Science*, 2008, 87, 1779–1795, doi: 10.3382/ps.2008-00070
7. Shakouri M.D., Iji P.A., Mikkelsen L.L., et al. Intestinal function and gut microflora of broiler chickens as influenced by cereal grains and microbial enzyme supplementation. *Animal Physiology Animal Nutrition*. 2009, 93, 647–658. doi: 10.1111/j.1439-0396.2008.00852.x
8. Ange K.D., Eisemann J.H., Argenzio R.A., et al. Effects of feed physical form and buffering solutes on water disappearance and proximal stomach pH in swine. *J. Animal Sci.*, 2000, 78, 2344–2352.
9. Duke G.E. Alimentary canal: secretion and digestion, special digestive functions, and absorption. *Avian Physiology*, 1986, 289–302.
10. Mikkelsen L.L., Naughton P.J., Hedemann M.S., et al. Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. *Applied Environmental Microbiology*, 2004, 70, 3485–3492. doi: 10.1128/AEM.70.6.3485-3492.2004
11. Fernandes P. Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme Res.*, 2010. doi: 10.4061/2010/862537
12. Lindberg J.E., Ogle B. Digestive physiology of pigs. UK. CABI Publishing, 2002. 476.
13. Gao Q., Moechnig B.W., Crenshaw J.D. Animal feed pelleting process and animal feed pellets produced therefrom. Patent US08991468. 1997.
14. Vu H., and Jake T. Non-starch-polysaccharides. Patent WO 99/30570. 2014
15. Bustany A.Z. The effect of pelleting an enzyme-supplemented barley-based broiler diet. *Animal Feed Sci. Technology*. 1996, 58(3), 283–288.
16. Chaari F., Belghith-Fendri L., Blibech M., et al. Biochemical characterization of a lichenase from *Penicillium occitanis* Pol6 and its potential application in the brewing industry. *Process Biochem.*, 2014, 49, 1040–1046. doi: 10.1016/j.procbio.2014.02.023
17. Chen X., Meng K., Shi P., et al. High-level expression of a novel *Penicillium* endo-1,3(4)- β -D-glucanase with high specific activity in *Pichia pastoris*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2012 39(6), 869–876. doi: 10.1007/s10295-012-1087-z
18. Elgharbi F., Hmida-Sayari A., Sahnoun M., et al. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lichenase from *Aspergillus niger* US368. *Carbohydr. Polym.*, 2013, 98(1), 967–975. doi:10.1016/j.carbpol.2013.07.009
19. Cheng R., Xu L., Wang S., et al. Recombinant expression and characterization of an acid-, alkali- and salt-tolerant beta-1,3-1,4-glucanase from *Paenibacillus* sp. S09. *Biotechnol. Lett.*, 2014, 36, 797–803. doi: 10.1007/s10529-013-1413-1
20. Cerda L.A., Valenzuela S.V., Diaz P., et al. New GH16 β -glucanase from *Paenibacillus barcinonensis* BP-23 releases a complex pattern of mixed-linkage oligomers from barley glucan. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2016, 63(1), 51–56. doi: 10.1002/bab.1348
21. Wen T.N., Chen J.L., Lee S.H., et al. A truncated *Fibrobacter succinogenes* 1,3–1,4- β -D-glucanase with improved enzymatic activity and thermotolerance. *Biochemistry*, 2005, 44, 9197–9205. doi: 10.1021/bi0500630
22. Teng D., Wan, 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

23. Masilamani, R., Sharma O.P., Muthuvel S.K., et al. Cloning, expression of beta- 1,3-1,4 glucanase from *B. subtilis* SU40 and the effect of calcium ion on the stability of recombinant enzyme: *in vitro* and *in silico* analysis. *Bioinformatics*, 2013, 9, 958–962. doi: 10.6026/97320630009958
24. Gellissen G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, 54(6), 741–750.
25. Cereghino J.L., Cregg J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol.Rev.*, 2000, 24, 45–66.
26. Sumner J. B., Somers G. F. Dinitrosalicylic method for glucose. In: Laboratory Expression in Biological Chemistry. New York, USA. *Academic Press*, 1949.
27. 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
28. Li Y., Xie Y., Zhu L., et al. Optimization of cloning and expression of beta-glucanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2009, 4, 542–548.
29. Hofemeister J., Kurtz A., Borriss R., et al. The beta-glucanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* shows extensive homology with that of *Bacillus subtilis*. *Gene*, 1986, 49(2), 177–187.
30. Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Калинина А.Н и др. Клонирование и экспрессия β -глюканазы *B. pumilus* Bg57 в *P. pastoris*: очистка и характеристика рекомбинантного фермента. *Биотехнология*, 2018, 34(5), 12–22. doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-5-12-22
31. Naatsaari L., Mistlberger B., Ruth C., et al. Deletion of the *P. pastoris* KU70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology. *PLoS ONE*, 2012, 7(6). doi: 10.1371/journal.pone.0039720

Comparison of β -Glucanases *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* in Expression System of *Pichia pastoris*: Biochemical Characteristics and Potential in Fodder Production

L.N. BORSHCHEVSKAYA^{1,*}, T.L. GORDEEVA¹, A.N. KALININA¹, A.S. FEDOROV¹ and S.P. SINEOKY¹

¹State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» – GOSNIIGENETIKA), 117545, Moscow Russia

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

Received October 12, 2018

Revised November 10, 2018

Accepted December 15, 2018

Abstract—The expression of four genes for bacterial endo- β -1,3(4)-D-glucanases from *B. pumilus* Bg57 (VKPM B-13195), *Paenibacillus polymyxa* Bg23 (VKPM B-4056), *Bacillus subtilis* Bg11 (VKPM B-13178), and *Bacillus amyloliquefaciens* Bg76 (VKPM B-13184), members of the family of GH16 glycohydrolases, in the expression system of *Pichia pastoris* has been compared. Such technologically valuable characteristics of the recombinant β -glucanases, as specific activity, pH and thermal stability, temperature and pH optima, resistance to digestive enzymes, and substrate specificity were investigated. It was shown that the enzymes from *B. pumilus* and *P. polymyxa* have the highest biotechnological potential for the creation of β -glucanase producers on the basis of the recombinant *P. pastoris* yeast strains for their further use in the fodder production.

Key words: β -glucanase, β -glucan, *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: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-12-21