

УДК 579.66

Экспрессия гена β -глюканазы из *Paenibacillus jamilae* Bg1 в *Pichia pastoris* и характеристика рекомбинантного белка

© 2019 Л.Н. БОРЩЕВСКАЯ^{1,*}, Т.Л. ГОРДЕЕВА¹, А.Н. КАЛИНИНА¹, А.В. СЕРКИНА¹, 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 в редакцию 07.06.2019 г.

После доработки 24.06.2019 г.

Принята к публикации 14.07.2019 г.

Описана изоляция, гетерологическая экспрессия и характеристика новой термостабильной β -глюканазы из *Paenibacillus jamilae*. Ген *bgl26* из штамма *P. jamilae* Bg1 ВКПМ В-13093, состоящий из 714 нуклеотидов, кодирует эндо-1,3-1,4- β -глюканазу (ЕС 3.2.1.73) из 213 аминокислот и 24 остатков предполагаемого сигнального пептида в N-концевой области. Нуклеотидная последовательность гена *bgl26* и аминокислотная последовательность зрелого белка Bg126 имеют наибольшую гомологию с последовательностями эндо-1,3-1,4- β -глюканазы *Paenibacillus macerans* (82 и 88%, соответственно). Фрагмент гена, кодирующий зрелый белок, был экспрессирован в *Pichia pastoris*. Очищенный рекомбинантный фермент Bg126 показал активность на β -глюкане ячменя. Оптимальный pH для работы фермента был равен 7, а оптимальный интервал температур составил 40–45 °С. Удельная активность β -глюканазы была на уровне 6650 ед/мг белка, K_m и V_{max} имели значения $6,4 \pm 0,3$ мг/мл и $9450,1 \pm 471,2$ мкмоль/мин·мг, соответственно. Рекомбинантный белок Bg126 характеризовался высокой pH- и термостабильностью, а также устойчивостью к пищеварительным ферментам. Показано также, что ионы Co^{2+} оказывают позитивное влияние на активность фермента.

Ключевые слова: β -глюканаза, β -глюкан, *Paenibacillus jamilae*, *Pichia pastoris*

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-15-23

β -глюканы – полисахариды, состоящие из мономеров D-глюкозы, связанных посредством β -1,3 и/или β -1,4 гликозидных связей. В зависимости от типа гликозидной связи β -глюканы можно разделить на основные категории: β -1,3-1,4-глюкан (β -глюкан ячменя и лишенин), β -1,4-глюкан (целлюлоза) и β -1,3-глюкан (ламинарин и β -глюкан из *Euglena gracilis*) [1].

β -глюканазы – ферменты, способные гидролизовать β -глюканы – классифицируются в соответствии с типами расщепляемых ими гликозидных

связей: эндо-1,3-1,4- β -глюканазы (ЕС 3.2.1.73), эндо-1,3(4)- β -глюканазы (ЕС 3.2.1.6), эндо-1,4- β -глюканазы (ЕС 3.2.1.4) и эндо-1,3- β -глюканазы (ЕС 3.2.1.39).

β -1,3-1,4-глюканы являются компонентами клеточной стенки эндосперма злаков, таких как ячмень, рожь, рис и пшеница, а также встречаются в лишайниках.

Большинство изученных микробных β -1,3-1,4-глюканаз принадлежит семейству гликозидгидролаз (GH) 16 и производится бактериями рода

Список сокращений: а.о. – аминокислотные остатки; ДНС-метод – метод определения ферментативной активности ксиланазы с ДНС-реактивом; ДНС – 3,5-динитросалициловая кислота (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS); пн – пара нуклеотидов; ПЦР – полимеразная цепная реакция; КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; EDTA (ЭДТА) – этилендиаминтетрауксусная кислота; SDS (ДДС-Na) – лаурилсульфат натрия; YPD среда – Yeast Extract-Peptone-Dextrose Medium

Bacillus [2–4]. Эндо-1,3(4)-β-глюканазы встречаются в основном в грибах, таких как *Botryotinia fuckeliana* [5],

Phaffia rhodozyma [6], *Rhizomucor miehei* [7], *Phanerochaete chrysosporium* [8], *Schizosaccharomyces pombe* [9].

β-глюканазы применяются как промышленные ферменты при производстве комбикормов для животных с однокамерным желудком и в пивоварении [10]. Применение β-глюканаз в процессе пивной ферментации приводит к увеличению экстракции семян ячменя и уменьшению количества суслу, снижению образования избыточной вязкости и осадка в пиве. В птицеводческих и свиноводческих отраслях водорастворимый β-глюкан действует как антипитательный агент. Добавка β-глюканаз в корм, содержащий ячмень, улучшает прирост массы тела сельскохозяйственных животных благодаря снижению вязкости содержимого тонкой кишки и повышению эффективности усвоения питательных веществ [11, 12].

Коммерческие эндо-β-глюканазы, используемые в настоящее время в производстве, получены, как правило, на основе ферментов грибов рода *Trichoderma* [13]. Однако свойства этих β-глюканаз не вполне соответствуют требованиям, предъявляемым к ферментам в кормопроизводстве и пивоварении. Например, была подчеркнута термолабильность коммерческих β-глюканаз [14, 15].

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

Цель данного исследования – клонирование и экспрессия гена β-глюканазы из *Paenibacillus jamilae* Bgl1 ВКПМ В-13193 в экспрессионной системе метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* и исследование свойств рекомбинантного фермента.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Микроорганизмы, питательные среды и плазмиды

Штамм *P. jamilae* Bgl1, способный синтезировать β-глюканазу, был изолирован из образца лесной почвы Московской обл. (Россия) и депонирован в БРЦ ВКПМ под номером В-13193.

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

Для генно-инженерных работ был использован штамм *Escherichia coli* XL1-Blue (*endA1 supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac hsdR17 F' [proAB lacIqZΔM15 Tn10]* ВКПМ В-9838).

ЛВ-среда (0,5% дрожжевой экстракт («Диа-М», Россия), 1% триптон («Диа-М»), 1% NaCl («Химмед», Россия)) была использована для культивирования *Escherichia coli* XL1 Blue. YPD-среда (1% дрожжевой экстракт («Диа-М»), 1,5% триптон («Диа-М»), 2% глюкоза («Химмед»)) была использована для культивирования *P. pastoris*.

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

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 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Множественное выравнивание последовательностей осуществляли в программе CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>), исследования трехмерных структур ферментов – на сервере SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) с помощью базы NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=XGGZ1VF0014&mode=all>). Для поиска сайтов гликозилирования использовали сервер NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Клонирование гена

Для амплификации гена *bgl26*, кодирующего β-глюканазу, применяли праймеры Bgl-1 (5'-AT GAAGNAGAANTNTTGGTTRAC-3') и Bgl-2 (5'-TT ATCTTTTGTGTAACGCANY-3')

Ген *bgl* секвенировали и депонировали в Genbank (№ MN053906). Ген, кодирующий β-глюканазу, клонировали в вектор pPIC-GAP и экспрессировали в *Pichia pastoris*.

Конструирование рекомбинантной экспрессионной плазмиды

Фрагмент ДНК, кодирующий зрелый белок Bgl26, был амплифицирован с использованием ПЦР *Pfu* ДНК-полимеразы (Fermentas, Литва) и двух синтетических праймеров (BglP.jam-f и BglP.jam-r). Праймер BglP.jam-f (5'-AAAGAATTCGC GGGGAATGTTTTTGGGAA-3') содержит EcoRI

сайт и праймер BglP.jam-r (5'-AAAGCGCCCGCTT AATTGCTCGTGTATTTTACC-3') содержит сайт NotI. Амплифицированный продукт, кодирующий зрелый фермент β -глюканазу, был клонирован в состав вектора pPIC-GAP, в результате чего была получена рекомбинантная плазмида, pPIC-GAP-BglP.jam. Последовательность, кодирующая β -глюканазу, была встроена в рамку считывания с сигнальной последовательностью вектора.

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

Плазмида pPIC-GAP-BglP.jam была линеаризована 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 пересеивали 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 добавлялась 2% глюкозы. После окончания ферментации определялась активность фермента в культуральной жидкости. 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 анионообменной хроматографии. Полученный ретентат наносили на колонку HiTrapQ FF (GE Healthcare, Великобритания), содержащую сорбент (SP-сефароза), уравновешенный 20 мМ трис-НСl буфером (рН 8,6). Элюцию белка осуществляли ступенчатым градиентом концентрации хлористого натрия. Целевой белок элюировался с колонки при 0,25М NaCl. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорд [15].

Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Электрофорез проводили в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии SDS в камере для вертикального электрофореза Mini-Protein 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 («Диа-М»).

Анализ ферментативной активности

Стандартное определение активности β -глюканазы проводили в 100 мкл, смешивая 50 мкл 1%-ного раствора субстрата в 0,5 М трис-НСl буфере (рН 7) и 50 мкл образца фермента. Инкубацию проводили 10 мин при 40 °С.

Восстанавливающие сахара определялись ДНС-методом с использованием глюкозы в качестве стандарта [16].

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

Субстратную специфичность определяли измерением активности с использованием в качестве субстрата β -глюкана ячменя (Megazyme, США), лихенина (Serva, Германия), β -1,3-глюкана из *Euglena gracilis* (Sigma, США), ксилана березы (Sigma), карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) («Химмед»).

Характеристика рекомбинантного Bgl26

рН-оптимум активности определяли инкубацией очищенного рекомбинантного белка Bgl26 с использованием в качестве субстрата β -глюкана ячменя в буферах: 0,5 М глициновый (рН 2–3), 0,5 М ацетатный (рН 4–6), 0,5 М трис-НСl (рН 7–9).

Влияние рН на стабильность Bgl1 оценивали с использованием тех же буферных систем в диапазоне рН 2–9.

Температурный оптимум активности определяли, проводя стандартное исследование активности фермента в диапазоне температур 30–80 °С.

Термостабильность определяли измерением остаточной активности фермента после инкубации в течение 10 мин при 70, 80, и 90 °С. Остаточную активность измеряли ДНС-методом.

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

K_m и V_{max} , рекомбинантного Bgl1 определяли методом Lineweaver-Burk, измеряя активность фермента при 40 °С в 0,5 М трис-НСl буфере (рН 7) с использованием 2,5–10 мг/мл β -глюкана ячменя в качестве субстрата.

Эффект устойчивости к протеолитическим ферментам был изучен 30-минутным инкубированием Bgl26 в присутствии 0,1%-ного раствора

Зрелый белок Bgl26 имел признаки, характерные для эндо-1,3-1,4- β -глюканаза (ЕС 3.2.1.73), относящихся к семейству GH16: присутствие консервативного мотива «EIDIE» и домена, включающего в себя два 7-цепочечных антипараллельных β -листа, которые, примыкая друг к другу, образуют компактный β -сендвич с желеобразной структурой [20].

Для экспрессии гена *Bgl26* в *P. pastoris* была использована плазмида pPIC-GAP, позволяющая осуществлять высокоэффективную конститутивную экспрессию гетерологичного гена под контролем GAP-промотора.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая область зрелого белка Bgl26, была амплифицирована методом ПЦР с использованием праймеров BglP.jam-f и BglP.jam-r и клонирована в единую рамку считывания с сигнальной последовательностью α -фактора. Таким образом, была сконструирована экспрессионная плазмида pPIC-GAP-Bgl26.

Экспрессионная плазмида была линейаризована и трансформирована в клетки *P. pastoris*. Трансформант Bgl26-117 показал самую высокую β -глюканазную активность среди 233 положительных клонов.

Ферментация клона Bgl26-117 проводилась в 500-мл колбе в течение 120 ч. Каждые 24 ч отбирались образцы объемом 1 мл. Результаты SDS-PAGE-анализа супернатанта КЖ показали, что концентрация рекомбинантного белка Bgl26 со временем увеличивалась. Уровень секреции Bgl26, определяемый по β -глюканазной активности, также увеличивался. Ферментативная активность к концу ферментации достигала 580 ед/мл.

Рекомбинантный фермент был очищен методом анионообменной хроматографии. По результатам проведенного SDS-PAGE электрофореза, молекулярный вес очищенного рекомбинантного фермента составил около 30 кДа, что больше, чем теоретически рассчитанная масса – 24,1 кДа, при этом белок был представлен в виде двойной полосы (рис. 2). 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 Bgl26 присутствуют три потенциальных сайта N-гликозилирования Asn-X-Ser/Thr [21].

На каждом этапе очистки белка проводили определение активности фермента в отношении β -глюкана ячменя. Очищенный рекомбинантный фермент Bgl26 показал высокую удельную активность – 6650 ед/мг белка (табл. 1). По этому показателю исследуемый белок уступает лишь бактериальной β -глюканазе *Fibrobacter succinogenes* (10800 ед/мг белка) [22].

Характеристики рекомбинантного Bgl26 были исследованы с использованием β -глюкана ячменя в качестве субстрата.

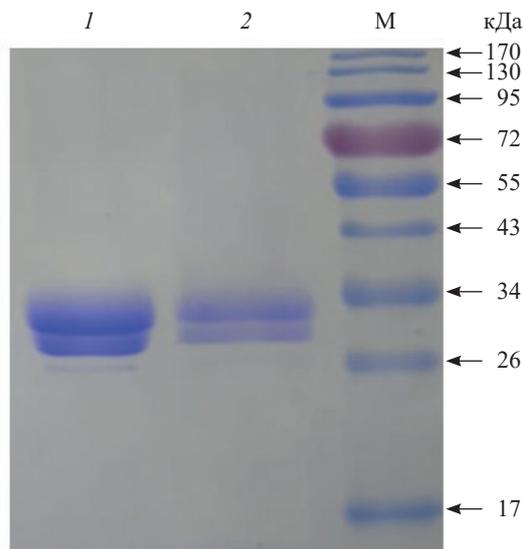


Рис. 2. SDS-PAGE-анализ белка Bgl26. 1 – неочищенный Bgl26; 2 – очищенный Bgl26; М – белковый маркер молекулярной массы

Fig. 2. SDS-PAGE analysis of Bgl26 protein. Lane 1, unpurified Bgl26 protein; lane 2, purified Bgl26 protein; M, standard protein molecular weight (Thermo Scientific)

Таблица 1

Очистка рекомбинантного Bgl26
Purification of recombinant Bgl26

Стадия очистки	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	Специфическая активность, ед/мг	Степень очистки
Супернатант	50	0,088	2954	1
Анионообменная хроматография на SP-сефарозе	3,1	0,4	6650	2,25

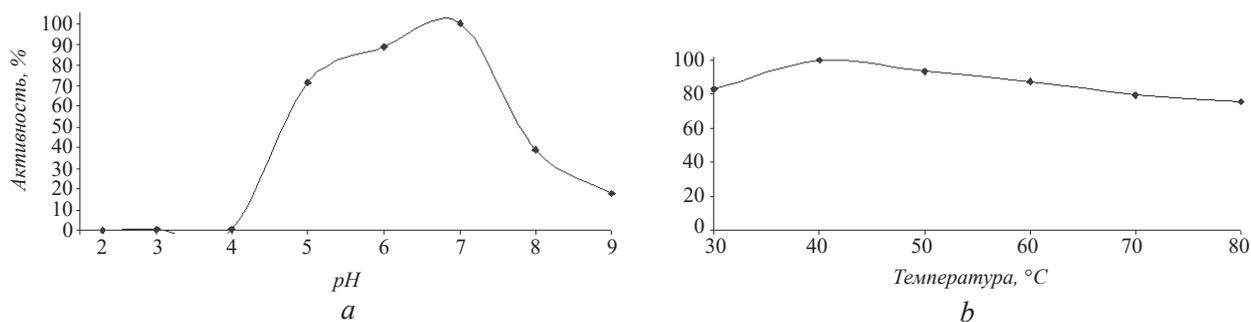


Рис. 3. Характеристики рекомбинантного Bgl26: *a* – влияние pH на активность; *b* – влияние температуры на активность. Данные, приведенные на графиках, представляют собой средние значения, полученные в результате проведения трех независимых измерений с учетом погрешности измерения ($p < 0,05$)

Fig. 3. Characterization of recombinant Bgl26. (*a*), effects of pH on activity, (*b*), effects of temperature on activity. Here and in Fig. 4 the data shown in the graphs represent the average value obtained as a result of three independent measurements, taking into account the measurement error ($p < 0.05$)

Кинетические параметры фермента были определены для гидролитической реакции на β -глюкане ячменя. Реакции были выполнены при оптимальных условиях pH 7 и 40 °C. K_m и V_{max} имели значения $6,4 \pm 0,3$ мг/мл и $9450,1 \pm 471,2$ мкмоль/мин·мг, соответственно.

Исследования показали, что pH-оптимум активности рекомбинантной β -глюканазы Bgl26 равен 7 (рис. 3*a*). Фермент был активен при pH от 4 до 9 и сохранял более 50% активности при pH от 4,7 до 7,8. При $pH \leq 4$ ферментативной активности не наблюдалось.

Изучение влияния температуры на активность Bgl26 показало, что температурный оптимум фермента находится в интервале 40–45 °C, при этом в диапазоне температур от 30 до 68 °C активность фермента составляет $\geq 80\%$ (рис. 3*b*).

Эффект pH на стабильность Bgl26 был изучен инкубированием фермента в буферных растворах с различными значениями pH при 37 °C в течение 30 мин. Фермент был устойчив в широком диапазоне значений pH, при этом более 70% активности сохранялось после инкубирования в интервале pH 3–8 (рис. 4*a*).

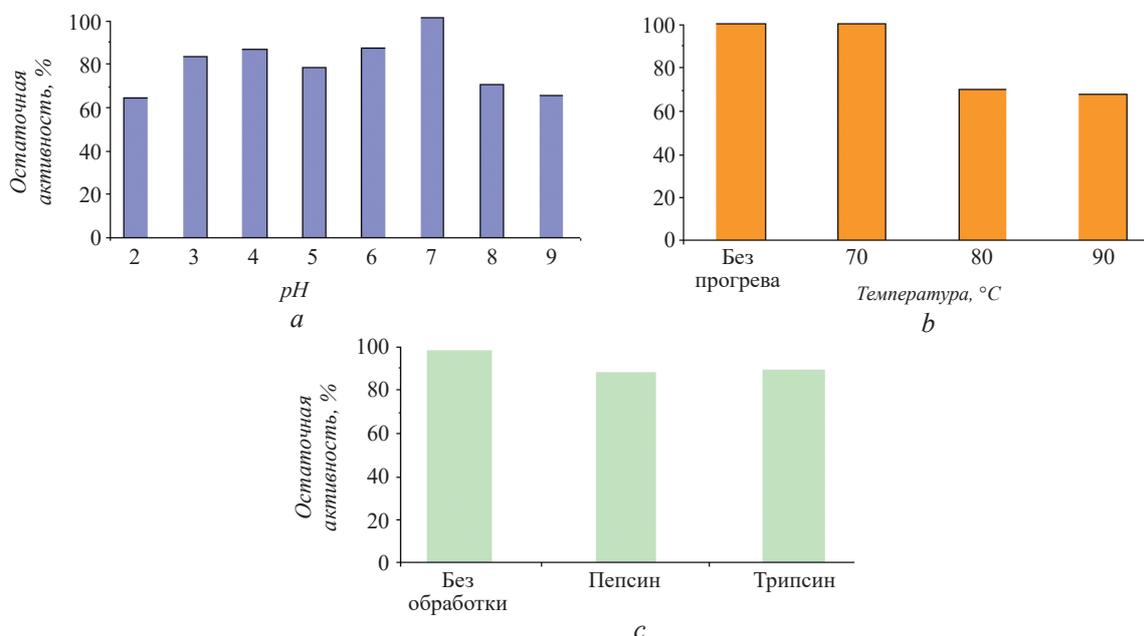


Рис. 4. Изучение pH-стабильности, термостабильности и устойчивости к пищеварительным ферментам рекомбинантного белка Bgl26: *a* – pH-стабильность; *b* – термостабильность; *c* – устойчивость к воздействию пепсина и трипсина. Показаны средние значения, полученные в результате проведения трех независимых измерений с учетом погрешности измерения ($p < 0,05$)

Fig. 4. Study of pH stability, thermostability, resistance to digestive enzymes Bgl26: (*a*), pH stability; (*b*), thermostability; (*c*), resistance to pepsin and trypsin

Фермент был устойчив при высоких температурах. Остаточная активность после прогревания Bgl26 при 70, 80 и 90 °C в течение 10 мин составила 100, 70 и 67,5%, соответственно (рис. 4b).

Белок Bgl26 был устойчив к пищеварительным ферментам. После обработки пепсином и трипсином в соответствующем буфере при 37 °C в течение 30 мин остаточная активность фермента составляла 88 и 91% соответственно (рис. 4c).

Специфическая активность очищенного фермента Bgl26 на различных субстратах была измерена при 40 °C и pH 7 в течение 10 мин (табл. 2).

Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что Bgl26 способен гидролизовать β -глюкан ячменя и лишенин, но не способен к гидролизу β -1,3-глюкана и КМЦ. Такая субстратная специфичность характерна для эндо-1,3-1,4- β -глюканаз (Е.С. 3.2.1.73). Однако очень низкая активность Bgl26 при использовании лишенина в качестве субстрата, которая составляет всего 1,5% от максимального уровня, не характерна для этого класса фермента. Субстратная специфичность Bgl26 требует дальнейшего изучения.

Была также исследована активность фермента в присутствии ионов металлов, EDTA и SDS (табл. 3). Влияние ионов Co^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Li^+ , а также ЭДТА приводило к увеличению активности фермента соответственно на 161,4, 21, 31,6, 15,8, 14 и 23,9%. Влияние Ni^{2+} , Cu^{2+} и SDS приводило к уменьшению активности Bgl26 соответственно на 31,6, 28,1 и 22,8%. Добавление других ионов металлов не оказывало существенного влияния на активность фермента.

Наибольшее влияние на активность Bgl26 оказывали ионы Co^{2+} , приводя к увеличению активности фермента более чем в 2,5 раза. В литературных источниках есть информация об увеличении активности гликозилгидролаз в присутствии ионов кобальта [23, 24], однако, это увеличение не превышает 15%. Известно также, что ионы кальция являются активатором ферментов этого класса – оказывают влияние на стабильность молекул β -глюканаз, что приводит к повышению термостабильности ферментов [25, 26]. Для β -глюканазы *P. macerans* был определен сайт связывания ионов кальция, расположенный в области периферической петли молекулы фермента [27].

Сравнение аминокислотных последовательностей β -глюканаз *P. macerans* и *P. jamilae* в области связывания ионов кальция показало (рис. 1), что Bgl26 имеет замены 34S/N, 35Y/G, 38P/S, 39S/G, 40T/A. Наиболее значимыми являются замены в положениях 35, 38 и 40, которые существенно изменяют конформацию и размер металлсвязывающей области. Возможно, данные замены приводят к тому, что активатором для Bgl26 становится ион кобальта. Однако, данное предположение требует дальнейшего изучения, функции аминокислотных остатков в указанных положениях должны быть в перспективе исследованы с использованием метода сайт-направленного мутагенеза.

Таким образом, были изучены свойства новой высокоактивной эндо-1,3-1,4- β -глюканазы из *P. jamilae* Bgl1ВКПМ В-13193 в экспрессионной системе *P. pastoris*.

Таблица 2

Субстратная специфичность очищенного Bgl26
Substrate specificity of the purified Bgl26

Субстрат	Специфическая активность, ед/мг белка	Активность, %
β -глюкан ячменя	6650	100
Лишенин	100	1,5
β -1,3-глюкан <i>Euglena gracilis</i>	0	0
КМЦ	0	0
Ксилан березы	73	1,1

Таблица 3

Влияние солей металлов и других соединений на активность Bgl26
The effect of metal salts and chemical reagents on the activity of Bgl26

Ион металла, химический реагент	Контроль	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Fe^{3+}	Ni^{2+}	Mn^{2+}	Co^{2+}	Li^+	Cu^{2+}	EDTA	SDS
Активность, %	100	103,5	98,2	121	115,8	131,6	68,4	108,8	261,4	114	71,9	123,9	77,2

Рекомбинантный белок обладает высокой удельной активностью, кинетическими параметрами, характерными для высокоактивного фермента, высокой термостабильностью, устойчивостью к действию пищеварительных ферментов. Температурный оптимум активности исследуемого фермента составил 40–45 °С, рН-оптимум 7, при этом его активность сохранялась на высоком уровне в широком диапазоне рН и температур. Фермент способен эффективно гидролизовать β -глюкан ячменя – основной некрахмальный полисахарид, входящий в состав сырья, используемого в кормопроизводстве и в пивоварении.

Выявленные свойства позволяют изученный нами фермент считать перспективным для создания на его основе дрожжевого рекомбинантного продуцента β -глюканазы для промышленного использования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

- McCarthy T., Hanniffy O., Savage A. V., Tuohy M. G. Catalytic properties and mode of action of three endo- β -glucanases from *Talaromyces emersonii* on soluble β -1,4- and β -1,3; 1,4-linked glucans. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2003, 33(1), 3, 141–148. doi: 10.1016/S0141-8130(03)00080-1
- Ekinici M.S., McCrae S.I., Flint H.J. Isolation and over-expression of a gene encoding an extracellular beta-(1,3-1,4)-glucanase from *Streptococcus bovis* JB1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63(10), 3752–3756.
- Teng D., Wang J.H., 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
- Huang H., Yang P., Luo H., et al. High-level expression of a truncated 1,3-1,4- β -D-glucanase from *Fibrobacter succinogenes* in *Pichia pastoris* by optimization of codons and fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 78(1), 95–103. doi: 10.1007/s00253-007-1290-4
- Martinez M. J., Reyes F., Lahoz R., Perez-Leblic M. I. Lytic enzymes in autolysis of *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters*, 1983, 19(2–3), 157–160. doi.org/10.1111/j.1574-6968.1983.tb00532.x
- 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(2), 215–222.
- Boyce A., Walsh G. Production, purification and application-relevant characterisation of an endo-1,3 (4)- β -glucanase from *Rhizomucor miehei*. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 76(4), 835–841. doi: 10.1007/s00253-007-1058-x
- 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.*, 2006, 71(6), 898–906. doi: 10.1007/s00253-005-0214-4
- Martín-Cuadrado A. B., Del Dedo J. E., De Medina-Redondo M., et al. The *Schizosaccharomyces pombe* endo-1,3- β -glucanase Eng1 contains a novel carbohydrate binding module required for septum localization. *Mol. Microbiol.*, 2008, 69(1), 188–200. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06275.x
- Anderson M.A., Stone B.A. A new substrate for investigating the specificity of β -glucan hydrolases. *FEBS Letters*, 1975, 52(2), 202–207. doi: 10.1016/0014-5793(75)80806-4
- Almirall M., Esteve-Garcia E. In vitro stability of a β -glucanase preparation from *Trichoderma longibrachiatum* and its effect in a barley based diet fed to broiler chicks. *Animal Feed Sci. Technol.*, 1995, 54(1–4), 149–158. doi: 10.1016/0377-8401(94)00757-Z
- Choct M. Enzymes supplementation of poultry diets based on viscous cereals. In: *Enzymes Farm Animal Nutrition*. Eds: Bedford M.R. and Partridge G.G. Wallingford, UK: CAB Internation, 2001, 145–160.
- Community register of feed additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003, Appendixes 3 & 4, Annex: List of additives. *European Commission* 2007, 9 <http://ec.europa.eu/food>
- Vahjen W., Simon O. Biochemical characteristics of non starch polysaccharide hydrolyzing enzyme preparations designed as feed additives for poultry and piglet nutrition. *Archives Animal Nutrition*, 1999, 52(1), 1–14.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248–254.
- Miller G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 1959, 31(3), 426–428.
- 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. General Genet. MGG*, 1990, 222(2–3), 278–283.
- Wolf M., Geczi A., Simon O., Borriss R. Genes encoding xylan and β -glucan hydrolysing enzymes in *Bacillus subtilis*: characterization, mapping and construction of strains deficient in lichenase, cellulase and xylanase. *Microbiology*, 1995, 141(2), 281–290.

19. Hahn M., Olsen O., Politz O., et al. Crystal structure and site-directed mutagenesis of *Bacillus macerans* endo-1,3-1,4-glucanase. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270(7), 3081–3088.
20. Gaiser O.J., Piotukh K., Ponnuswamy M. N., et al. Structural basis for the substrate specificity of a *Bacillus* 1,3-1,4- β -glucanase. *J. Molecular Biology*, 2006, 357(4), 1211–1225. doi: 10.1016/j.jmb.2006.01.014
21. Cereghino J.L., Cregg J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2000, 24(1), 45–66. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x
22. 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(25), 9197–9205. doi: 10.1021/bi0500630
23. Bai Y., Wang J., Zhang Z., et al. A novel family 9 β -1,3 (4)-glucanase from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4 with potential applications in the brewing industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 87(1), 251–259. doi: 10.1007/s00253-010-2452-3.
24. Teng D., Fan Y., Yang Y.L., et al. Codon optimization of *Bacillus licheniformis* β -1,3-1,4-glucanase gene and its expression in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 74(5), 1074–1083. doi: 10.1007/s00253-006-0765-z
25. Furtado G.P., Ribeiro L.F., Santos C.R., et al. Biochemical and structural characterization of a β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168. *Process Biochemistry*, 2011, 46, 1202–1206.
26. Masilamani R., Sharma O P., Muthuvel S.K., Natarajan S. Cloning, expression of b-1,3-1,4 glucanase from *Bacillus subtilis* SU40 and the effect of calcium ion on the stability of recombinant enzyme: in vitro and in silico analysis. *Bioinformation*, 2013, 9(19), 958. doi: 10.6026/97320630009958
27. Welfle K., Politz O., Borriss R., Misselwitz R., Welfle H. Individual amino acids in the N-terminal loop region determine the thermostability and unfolding characteristics of bacterial glucanases. *Protein Science*, 1996, 5(11), 2255–2265.

Expression of Gene for β -glucanase from *Paenibacillus jamilae* Bg1 in *Pichia pastoris* and Characteristics of Recombinant Enzyme

L.N. BORSHCHEVSKAYA^{1,*}, T.L. GORDEEVA¹, A.N. KALININA¹, A.V. SERKINA¹, 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), Moscow, 117545 Russia

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

Received June 07, 2019

Revised June 24, 2019

Accepted July 14, 2019

Abstract—The isolation, heterologous expression and characterization of a new thermostable β -glucanase from *Paenibacillus jamilae* is described. The bgl26 gene from the *P. jamilae* Bg1 VKPM B-13093 strain consisting of 714 nucleotides encodes endo-1,3-1,4- β -glucanase (EC 3.2.1.73) containing 213 amino acids and 24 residues of the putative signal peptide in N-end area. The nucleotide sequence of the bgl26 gene and the amino acid sequence of the mature Bgl26 protein have the greatest homology with the sequence of the *Paenibacillus macerans* endo-1,3-1,4- β -glucanase (82 and 88%, respectively). A fragment of the gene encoding the mature protein was expressed in *Pichia pastoris*. Purified recombinant enzyme Bgl26 was active towards barley β -glucan. The optimal pH for the enzyme to work was 7,0, and the optimum temperature range was 40–45 °C. The specific activity of β -glucanase was at the level of 6650 U/mg of protein, K_m and V_{max} were equal to 6.4 ± 0.3 mg/mL and 9450.1 ± 471.2 μ mol/(min·mg), respectively. The recombinant protein Bgl26 was characterized by high pH and thermal stability, as well as resistance to digestive enzymes. It is also shown that Co²⁺ ions have a positive effect on the activity of the enzyme.

Key words: β -glucanase, β -glucan, *Paenibacillus jamilae*, *Pichia pastoris*

Fundings—The work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Unique Project Identifier RFMEFI60717X0179) and was carried out using the Multipurpose Scientific Installation of National Bio-Resource Center «All-Russian Collection of Industrial Microorganisms», NRC «Kurchatov Institute» – GOSNIIGENETIKA.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-15-23