

УДК 577.152,577.113,579.252

**СВОЙСТВА ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ
И ГОМОГЕННЫХ ФЕРМЕНТОВ ЭНДОГЛЮКАНАЗЫ EG2
Penicillium verruculosum И ЭНДОГЛЮКАНАЗЫ LAM
*Myceliophthora thermophila***

© 2015 Д.А. Мерзлов^{1*}, И.Н. Зоров^{1,2}, Г.С. Доценко²,
Ю.А. Денисенко², А.М. Рожкова², А.Д. Сатрутдинов²,
Е.А. Рубцова², Е.Г. Кондратьева², А.П. Сеницын^{1,2}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва; факс: +7(495)932-8846,
электронная почта: dmitriymerzlov@gmail.com

² Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва;
факс: +7(495)954-2732, электронная почта: inbi@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 25.11.14

После доработки 30.12.14

Гены двух β-глюкан-эндодеполимераз EG2 (36,2 кДа) *Penicillium verruculosum* и LAM (30,8 кДа) *Myceliophthora thermophila* были успешно клонированы в *P. verruculosum*, получены и охарактеризованы ферментные препараты (ФП), имеющие высокую активность по β-глюкану и ламинарину, а также высокую стабильность β-глюканазной активности. Выделены и охарактеризованы гомогенные ферменты EG2 (классифицирован как КФ 3.2.1.4) и LAM (классифицирован как КФ 3.2.1.6). Значение K_m EG2, определенной по β-глюкану, была в ~10 раз выше, чем у LAM, однако EG2 обладала большей процессивностью за счет более высокого значения k_{cat} . Диапазоны оптимальных pH и температур EG2 и LAM перекрывались и составляли 4,3–4,9 и 61–67°, при этом EG2 оказалась более стабильной, чем LAM. Показано, что в результате гидролиза β-глюкана и ламинарина исследуемыми ферментами образуются олигосахариды со степенью полимеризации от 2 до 10. Установлено, что полученные рекомбинантные ФП при одинаковой дозировке с коммерческими ФП обеспечивали более быстрое и более существенное уменьшение приведенной вязкости цельнозернового экстракта ячменя, что делает их перспективными для использования их в качестве кормовой добавки для разрушения некрахмальных полисахаридов зерна.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эндоглюканаза, β-глюкан, β-глюкан-эндодеполимеразы, ферментные препараты, *Penicillium verruculosum*, *Myceliophthora thermophila*.

Злаковые культуры (овес, рожь, ячмень, пшеница и др.) широко применяются для производства кормов, используемых в животноводстве. Однако эти источники питательных веществ содержат некрахмальные полисахариды (НПС), которые отрицательно влияют на переваримость корма [1]. Попадание растворимых НПС с кормами в желудочно-кишечный тракт моногастричных животных (домашняя птица) приводит к образованию вязких желеобразных субстанций, которые затрудняют доступ пищеварительных соков к питательным веществам, ухудшая их усвояемость [1, 2].

Основным НПС ячменя и овса являются β-глюканы, представляющие собой умеренно растворимые в воде линейные полисахариды, в которых остатки D-глюкопиранозы соединены 1,3-β-

и 1,4-β-гликозидными связями. Общее содержание НПС в сухом веществе ячменя и овса обычно составляет 3,7–7,0 и 3,0–6,0% соответственно [2, 3].

Ферменты, способные гидролизовать различные β-глюканы по неупорядоченному механизму, называют β-глюкан-эндодеполимеразами и относятся к под-подклассу гликозил-гидролаз (КФ 3.2.1.X). В настоящее время известно четыре группы представителей данного под-подкласса таких ферментов: целлюлазы (3.2.1.4), лихеназы (3.2.1.73), эндо-1,3(4)-β-глюканазы (3.2.1.6) и ламинариназы (3.2.1.39) (<http://www.brenda-enzymes.org/>).

Использование в кормопроизводстве ФП β-глюканаз позволяет уменьшить вязкость содержимого кишечника моногастричных животных и, тем самым, повышает усвояемость питательных веществ [1].

* Адресат для корреспонденции.

Цель данной работы – получение и изучение свойств новых рекомбинантных ФП с увеличенной β -глюканазной активностью, полученных на основе реципиентного штамма мицелиального гриба *P. verruculosum*, а также изучение свойств индивидуальных эндоглюканаз с высокой β -глюканазной активностью – эндоглюканазы EG2 (*P. verruculosum*) и эндоглюканазы LAM (*M. thermophila*).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Субстраты. Для определения активностей ФП и очищенных ферментов использовали следующие субстраты: *n*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид (пНФГ), глюкуроноксилан березы (ксилан), Na-соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), ламинарин, курдлан («Sigma», США); микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ, ООО «МК-Центр», Россия), дополнительно обработанную на шаровой мельнице АГО-2 (ОАО «Восточно-сибирский комбинат биотехнологий», Россия); β -глюкан ячменя («Megazyme», Ирландия).

Прочие реактивы. Для приготовления реактивов Шомоди–Нельсона, Лоури и буферных растворов использовали реактивы марок х.ч., ч.д.а. и ос.ч. производства «АО Реахим» (Россия), «MP Biomedicals Inc.» и «Sigma» (США).

Для проведения ферментаций использовали глюкозу («Roquette Pharma», Франция), пшеничные отруби (ООО «Энзим», Украина), МКЦ (ООО «МК-Центр», Россия), дрожжевой экстракт («Lesaffre», Франция).

В качестве минеральных компонентов питательных сред использовали реактивы производства «Лабтех» (Россия), «АО Реахим» (Россия), «Химмед» (Россия), «MP Biomedicals Inc.» и «Sigma» (США).

Проведение ПЦР и получение генетических конструкций. Для проведения ПЦР был использован амплификатор «MyCycler» («Bio-Rad», США). Для амплификации генов *egl2* или *lamI* использовали в качестве матрицы геномную ДНК, выделенную из мицелия штаммов *P. verruculosum* и *M. thermophila* соответственно. Для проведения ПЦР использовали смесь высокоточной и процессивной полимераз – long polymerase mix, 10 × long polymerase PCR buffer + MgCl₂ и dNTP mix («Thermo Scientific», США). ПЦР проводили при следующих условиях: первичная денатурация проходила при 95° 5 мин; денатурация в цикле при 95° 1,5 мин; отжиг праймеров в течение 1 мин при 52°; элонгация в течение 1,5–2 мин (в зависимости от длины полинуклеотидной последовательности гена) при 68°, 25 цик-

лов. ПЦР с использованием плазмидной ДНК проводили по схеме: первичная денатурация проходила при 95° 45 с; денатурация в цикле при 95° 30 с; отжиг при 50–55° 1 мин; элонгация при 68° 1,5–2 мин в зависимости от длины полинуклеотидной последовательности гена, 20–25 циклов.

Полученный ПЦР-продукт был клонирован методом независимого лигирования [4]. ПЦР-продукт выделяли из агарозного геля и очищали, используя набор реагентов фирмы «QIAGEN» (Германия) в соответствии с методикой фирмы-производителя. Далее ПЦР-продукт и линейризованный вектор pUC-SVNI обрабатывали T4-ДНК полимеразой («Thermo Scientific», США) в присутствии деоксиаденозинтрифосфата dATP и деокситимидинтрифосфата dTTP («Thermo Scientific», США) в течение 30 мин при 22° [4]. Обработанная вставка была лигирована в pUC-SVNI вектор, полученный ранее [5], путем смешивания 50 нг вектора и 150 нг вставки. Смесь инкубировали 30 мин при 22°, после чего трансформировали в клетки *E. coli* MACH1 («Invitrogen», США) по стандартному протоколу трансформации, описанному в лабораторных протоколах [6].

Скрининг трансформантов. Трансформанты *P. verruculosum* культивировали в колбах Эрленмейера при 30° в течение 6 сут, объем ферментационной среды – 100 мл. Среда включала следующие компоненты (в г/л): МКЦ – 40, пшеничные отруби – 10, дрожжевой экстракт – 10, глюкоза – 10, KH₂PO₄ – 15, (NH₄)₂SO₄ – 5, MgSO₄ · 7H₂O – 0,3, CaCl₂ · 2H₂O – 0,3. Отбор трансформантов осуществляли по результатам исследования культуральной жидкости (КЖ) с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза и измерения активностей по полисахаридным субстратам (КМЦ, β -глюкан и ламинарин). Ds-Na-ПААГ-электрофорез проводили на приборе Model 3000Xi с MiniProtean Tetra Cell («Bio-Rad Laboratories», США), руководствуясь методикой производителя. Окраску белка в гелях производили красителем Coomassie-Brilliant Blue R-250 («Ferak», Германия). В качестве стандарта для ПААГ-Ds-Na-электрофореза использовали смеси белков #26612 (20–120 кДа) производства «Thermo Scientific» (США). Концентрацию белка определяли с помощью модифицированного метода Лоури, используя БСА в качестве стандарта [7, 8], или по оптическому поглощению образцов при 280 нм. Измерения проводили, используя спектрофотометр Cary 50-Scan («Varian», США).

Определения активности ФП и очищенных ферментов. Активность по полисахаридным субстратам (МКЦ, КМЦ, ксилан, β -глюкан, ламинарин, курдлан, лихенан) определяли по начальным скоростям образования восстанавли-

вающих сахаров (ВС), используя модифицированный метод Шомоди–Нельсона [9]. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС в мин, рН 5,0, при концентрации субстрата 5 г/л и температуре 50° (в случае МКЦ – 40°).

Целлобиазную (β -глюкозидазную) активность определяли, используя пНФГ в качестве субстрата, измеряя начальную скорость образования *n*-нитрофенола [10]. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль *n*-нитрофенола при рН 5,0 и 40° за 1 мин.

Наработка ФП. Культивирование рекомбинантных штаммов осуществляли в трехлитровых ферментерах фирмы «ПроИнтех» (Россия) в течение 144 ч при 30° на ферментационной среде того же состава, который использовали при культивировании трансформантов в колбах. По окончании ферментации КЖ центрифугировали при 4000 об/мин в течение 1 ч на центрифуге Avanti J6-MI («BeckmanCoulter», США). Полученный супернатант подвергали ультра-концентрированию при 4° на мембране Biomax 5K, картридж Pellicon XL 50 («Millipore», США), концентраты были заморожены при температуре –70° и лиофильно высушены на лиофильной сушке Benchtop 9L ES («VirTis», США).

Фракционирование ФП и выделение эндоглюканаз. Выделение эндоглюканаз *P. verruculosum* и *M. thermophila* осуществляли в три этапа: обессоливание ФП, анионообменная хроматография (АОХ) ферментного комплекса и гидрофобная хроматография (ГФХ). Все стадии фракционирования и очистки осуществляли с использованием хроматографической системы АКТА UPLC («GE Healthcare», Швеция), которая состояла из автоматического контроллера, насосов, ультрафиолетового проточного детектора, кондуктометра и коллектора фракций.

Предварительно растворенные в 0,01 М Na-ацетатном буфере, рН 5,0, ФП обессоливали на колонке с носителем BioGel P2 («Bio-Rad», США), уравновешенной 0,01 М буфером Bis-Tris/HCl, рН 6,5. Для осуществления АОХ использовали колонку объемом 8 мл, заполненную носителем Source 15Q («GE Healthcare», США). Пробу обессоленного препарата, содержащую около 100 мг белка, наносили на колонку, уравновешенную 0,01 М буфером Bis-Tris/HCl, рН 6,5. Элюирование связавшегося с носителем белка проводили в градиенте концентрации NaCl от 0 до 0,4 М при скорости потока 3 мл/мин. Полученные фракции, обладающие активностью по β -глюкану и ламинарину, подвергали ГФХ на колонке с носителем Source 15 ISO («GE Healthcare», США), уравновешенной 0,05 М Na-аце-

татным буфером, рН 5,0 в присутствии 1,7 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Связавшийся с носителем белок элюировали 0,05 М Na-ацетатным буфером, рН 5,0 в линейно убывающем градиенте $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ от 1,7 до 0 М, скорость элюирования составляла 7 мл/мин.

Фракции, полученные после ГФХ, обессоливали на колонке с носителем BioGel P2, уравновешенной 0,05 М Na-ацетатном буфером, рН 5,0.

Идентификация эндоглюканаз методом масс-спектрометрии. Исследования осуществляли по стандартной методике [11]. Масс-спектрометрический анализ проводили в ЦКП «Прикладные биотехнологии» ИНБИ РАН на приборе Ultraflexxtreme фирмы «Bruker Daltonics», Германия. Полученные массы пептидов анализировали с помощью MASCOT (<http://www.matrix-science.com>) [12], а также сопоставляли с теоретически рассчитанными молекулярными массами возможных пептидов, полученных с использованием программы PeptideMass (<http://expasy.org/tools/peptide-mass.html>), исходя из известных аминокислотных последовательностей EG2 и LAM.

Определение кинетических параметров (K_m и V_{max}) действия эндоглюканаз на β -глюкан и ламинарин определяли из зависимостей начальных скоростей реакций гидролиза (50°, рН 5,0) от концентрации субстрата (1–5 г/л) в координатах Лайнуивера–Берка.

Определение температурного и рН-оптимума активности ФП и очищенных ферментов. В экспериментах по изучению рН зависимости активности по β -глюкану использовали 0,2 М ацетат-фосфатный буфер (рН 3,0–7,0). Температурный профиль активности по β -глюкану определяли в диапазоне 30–80° с шагом 5° при рН 5,0. Оптимальным считали интервал значений рН или температуры, в котором наблюдалось сохранение не менее 90% максимальной активности по β -глюкану.

Изучение термостабильности ФП. Растворы ФП в 0,1 М Na-ацетатном буфере, рН 5,0, инкубировали при 50 и 80°. В процессе инкубации отбирали аликвоты, в которых определяли остаточную активность по β -глюкану. Результаты представляли в виде зависимости остаточной активности (в процентах от исходной) от времени инкубирования.

Исчерпывающий гидролиз ламинарина, β -глюкана и анализ продуктов гидролиза. Очищенные эндоглюканазы EG2 и LAM инкубировали с растворами ламинарина и β -глюкана (5 г/л) в 0,05 М Na-ацетатном буфере при 50° в течение 24 ч. Концентрация фермента была подобрана таким образом, что в течение 10 мин реакции

осуществлялся гидролиз 1% всех гликозидных связей в субстрате. В процессе гидролиза отбирали пробы, в которых определяли ВС, используя метод Шомоди–Нельсона [9]. Состав продуктов гидролиза определяли методом ВЭЖХ с помощью жидкостного хроматографа высокого давления Agilent 1100 Series («Agilent Technologies», США) на колонке CarboPac PA-100 («Dionex», США). В качестве детектора использовали электрохимический детектор Coulochem III ESA («Dionex», США) с золотым электродом в режиме пульсирующей амперометрии. В качестве стандартов использовали моно- и олигосахариды («Merck», Германия).

Приготовление цельнозернового водного экстракта ячменя. Ячмень (урожай 2013 г., Витебская обл., Республика Беларусь) был предварительно измельчен до размера частиц ~0,5 мм на мельнице MF 10.1 («IKA», Германия). Для приготовления экстракта использовали 0,2 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0 в расчете 30 мл на 10 г измельченного ячменя. Экстракцию проводили в течение 2,5 ч при 40°, 140 об/мин в шейкере Innova 40 («New Brunswick Scientific», США). Полученный экстракт центрифугировали 10 мин, 4000 об/мин на центрифуге Universal 320R («Hettich», Швейцария), супернатант фильтровали через полиэфирную ткань.

Изучение влияния ФП на вязкость цельнозернового экстракта ячменя. К 5 мл экстракта ячменя, предварительно прогретого до 40° 10 мин, добавляли 50 мкл раствора ФП (10 мг/мл белка) в 0,2 М натрий-ацетатном буфере, pH 5,0, и через определенные промежутки времени измеряли время истечения экстракта с помощью метода капиллярной вискозиметрии (при 40°). Время реакции отсчитывали от момента добавления к экстракту раствора ФП. Результаты представляли в виде зависимости приведенной вязкости экстракта после добавления раствора ФП к приведенной вязкости исходного экстракта от времени ферментативной обработки. Приведенная вязкость определяется выражением:

$$\eta_{\text{прив}} = (\eta_{\text{экстракт}} - \eta_{\text{буфер}}) / \eta_{\text{буфер}} \times C,$$

где $\eta_{\text{экстракт}}$, $\eta_{\text{буфер}}$ – вязкость экстракта и буфера, определенная с помощью метода капиллярной вискозиметрии, C – концентрация полимера (г/л).

Время ферментативной обработки рассчитывали как сумму времени реакции, прошедшего до начала измерения времени истечения, и половины измеренного времени истечения (за исключением начальной точки – время ферментативной обработки равно времени начала реакции).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение экспрессионных конструкций и трансформация штамма-реципиента. При использовании геномных ДНК *P. verruculosum* и *M. thermophila* в качестве матрицы, методом ПЦР были амплифицированы и выделены фрагменты, соответствующие целевым генам *eglII* и *lamI*, кодирующие эндогликоканазы *P. verruculosum* EG2 и *M. thermophila* LAM соответственно, которые затем были клонированы в вектор pUC-SВНI, содержащий нуклеотидные последовательности, соответствующие промоторной и терминаторной области гена целлюбиогидролазы I (*cbhI*) *P. verruculosum*, а также необходимые генетические элементы для репликации в клетках *E. coli* (рис. 1).

Плазмиды pPrСВНI-EGII_B1 и pPrСВНI-Lam70_C1 были трансформированы в компетентные клетки *E. coli* MachI, затем была проведена котрансформация штамма-реципиента *P. verruculosum* 537 *niaD*⁻ (B1-537) смесью полученных плазмид совместно с плазмидой pSTA10, несущей ген нитратредуктазы (*niaD*), обеспечивающей комплементацию дефектного гена нитратредуктазы в штамме реципиента для обеспечения положительной селекции трансформантов на агаризованных средах с 0,01 М NaNO₃. Скрининг полученных трансформантов осуществляли, как описано в разделе «Методы исследования». В результате были отобраны три рекомбинантных штамма (B1-EL-41, B1-EL-49, B1-EL-62), в КЖ которых были обнаружены более высокие значения активности по КМЦ, β-глюкану и ламинарину относительно КЖ штамма-реципиента (данные не приведены).

Получение рекомбинантных ФП EG2 и LAM. Была проведена ферментация трех отобранных штаммов *P. verruculosum* и штамма реципиента (B1-537) в ферментерах (объем 3 л) и получены три сухих ФП (EL-41, EL-49, EL-62) и ФП С-537. Исследование рекомбинантных ФП с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза (рис. 2) показало, что по сравнению с ФП С-537 штамма реципиента во всех трех рекомбинантных ФП наблюдалось заметное увлечение белковых полос в районе 42 и 31 кДа (соответствующих, как предполагалось, EG2 и LAM). Эти белковые полосы были вырезаны, обработаны трипсином, а полученные гидролизаты были исследованы с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии (идентификацию белковых полос проводили, как описано в разделе «Методы исследования»). В результате было установлено, что полосы на электрофореграмме (рис. 2) 42 и 31 кДа принадлежат EG2 и LAM соответственно. Следует отметить, что целевые ферменты являлись преоб-

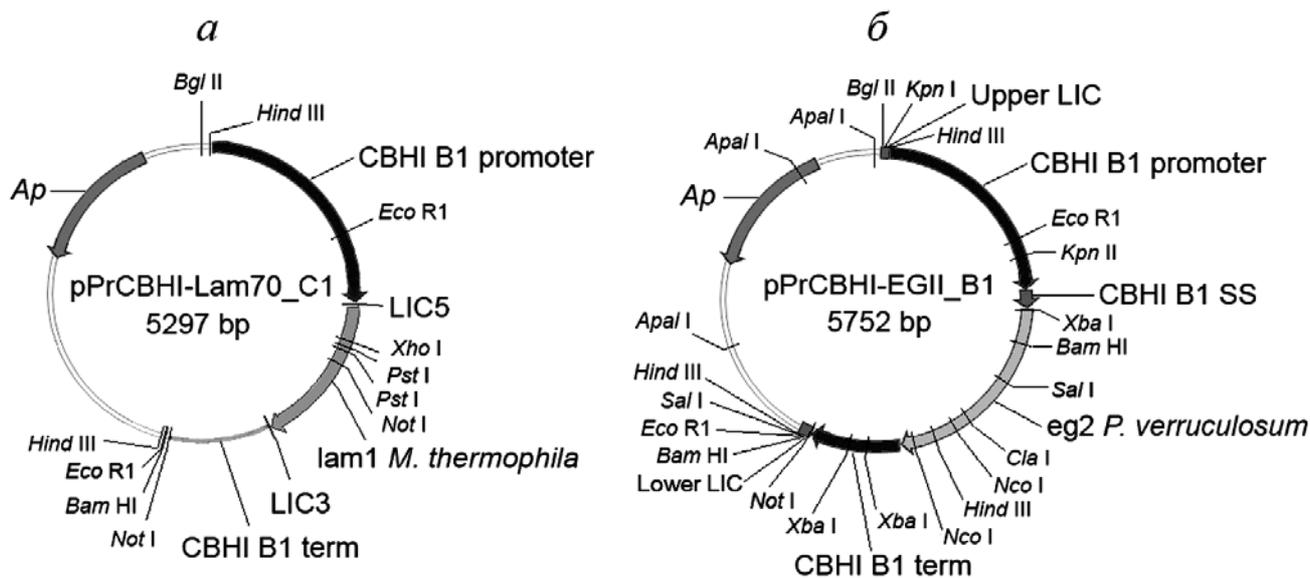


Рис. 1. Схема экспрессионных плазмид pPrCBHI-Lam70_C1(a) и pPrCBHI-EG2_B1 (б) для трансформации реципиентного штамма *P. verruculosum* 537 niaD⁻

ладающими компонентами рекомбинантных ФП по сравнению с ФП С-537 (рис. 2), при этом во всех полученных рекомбинантных ФП присутствовали ферменты целлюлазного комплекса, продуцируемого реципиентным штаммом (В1-537).

Таким образом, использование фланкирующих элементов гена *cbhI* приводило к частичной замене гена *cbhI* на ген гомологичного (*egl2*) или гетерологичного (*lam1*) белка в процессе рекомбинации по механизму двойного кроссинговера.

Выделение и очистка EG2 и LAM. Фракционирование полученных ФП осуществляли по методике, описанной в разделе «Методы исследования». На рис. 3 приведена хроматограмма, полученная в результате фракционирования ФП EL-62 методом АОХ (при фракционировании ФП EL-41 и EL-49 были получены аналогичные хроматографические профили).

Фракции, обладающие высокой активностью по ламинарину и β-глюкану (фракция 1) и β-глюкану (фракция 2), подвергли ГФХ на носителе Source 15 ISO. Результаты приведены на рис. 4.

Результаты Ds-Na-ПААГ-электрофореза фракций, полученных после гидрофобной хроматографии (рис. 5), свидетельствовали, что ферменты LAM (31 кДа) и EG2 (42 кДа) были выделены в гомогенном виде.

Оценка состава ФП была проведена следующим образом. С использованием программного обеспечения Unicorn 5.1 были проинтегрирова-

ны хроматографические профили элюирования белков после АОХ. Содержание целевых ферментов определяли, используя коэффициенты

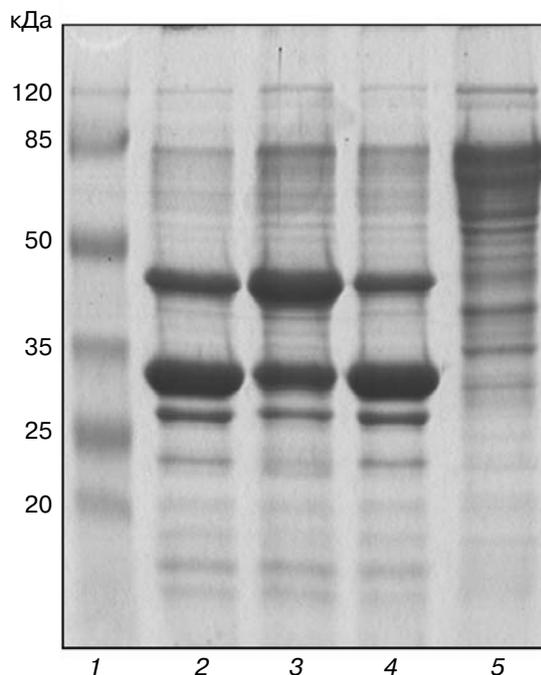


Рис. 2. Электрофореграммы полученных ФП: 1 – стандартные маркеры для Ds-Na-ПААГ-электрофореза, 2 – EL-41, 3 – EL-49, 4 – EL-62, 5 – С-537

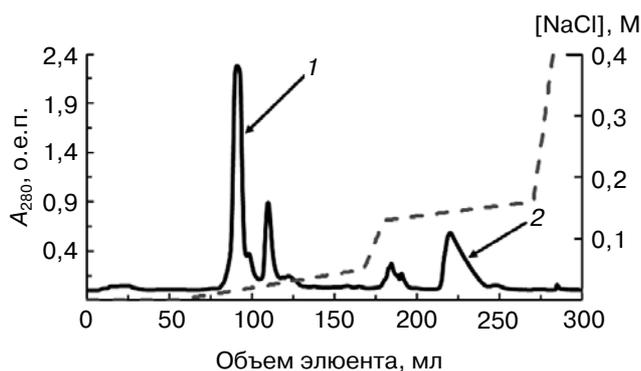


Рис. 3. Фракционирование ФП EL-62, полученного методом АОХ в восходящем градиенте NaCl на колонке с носителем Source 15Q, pH 6,5 (по правой оси отложен градиент концентрации соли). Цифрами обозначены фракции: 1 – LAM 31 кДа, 2 – EG2 42 кДа

пересчета (из A_{280} в мг/мл), полученные на основании данных о первичной аминокислотной последовательности с помощью ресурса <http://web.exPASy.org/protparam>. Для LAM и EG2 он составлял 2,985 и 2,261 мг/(мл · см) соответственно. Состав препаратов представлен в табл. 1.

По сравнению с исходным ФП штамма-реципиента С-537 (содержащего только 3% EG2 и не имевшего в своем составе LAM), все полученные ФП отличались повышенным содержанием EG2. Наибольшее содержание данного фермента было обнаружено в ФП_49 (31%), наименьшее содержание было обнаружено в ФП EL-62 (17%). В случае LAM наибольшее ее содержание было обнаружено в ФП EL-62 (44%), а наименьшее в ФП EL-49 (23%).

Субстратная специфичность очищенных EG2 и LAM. Согласно современным представлениям о субстратной специфичности [13], для эндоглиуканаз характерна высокая активность по отношению к 1,4-β-глюкану и КМЦ (гидролиз 1,4-β-гликозидных связей). Наряду с 1,4-β-гликозидными связями, эндоглиуканазы способны гидролизовать 1,3-β-гликозидные связи, например, в (1,4;1,3)-β-глюкане и 1,3-β-глюкане [2].

Удельные активности исследованных β-глюкан-эндодеполимераз EG2 и LAM по отношению к различным субстратам приведены в табл. 2.

EG2 обладала близкими значениями активности по КМЦ и β-глюкану (это было характерно и для фермента дикого типа [14]). Дополнительно установлено, что рекомбинантный фер-

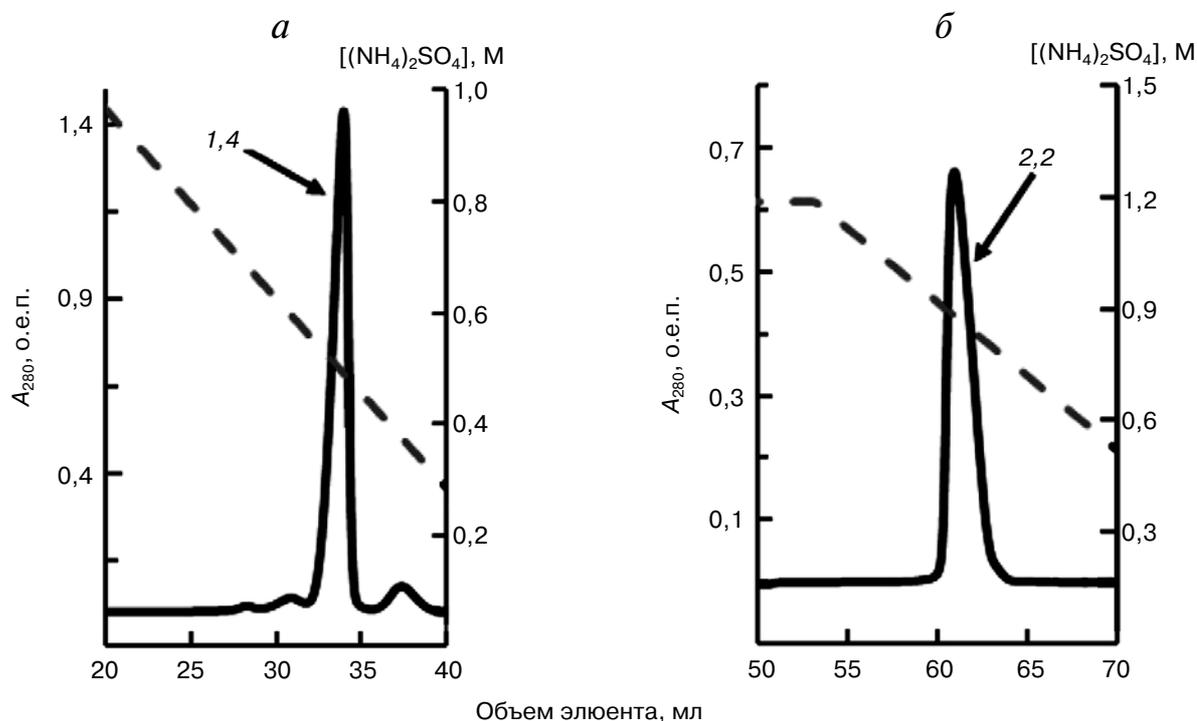


Рис. 4. Разделение фракций 1 (а) и 2 (б) методом ГФК на колонке с носителем Source 15 ISO в ниспадающем градиенте $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (по левой оси отложен градиент концентрации соли). Цифрами обозначены фракции: 1,4 – LAM 31 кДа, 2,2 – EG2 42 кДа

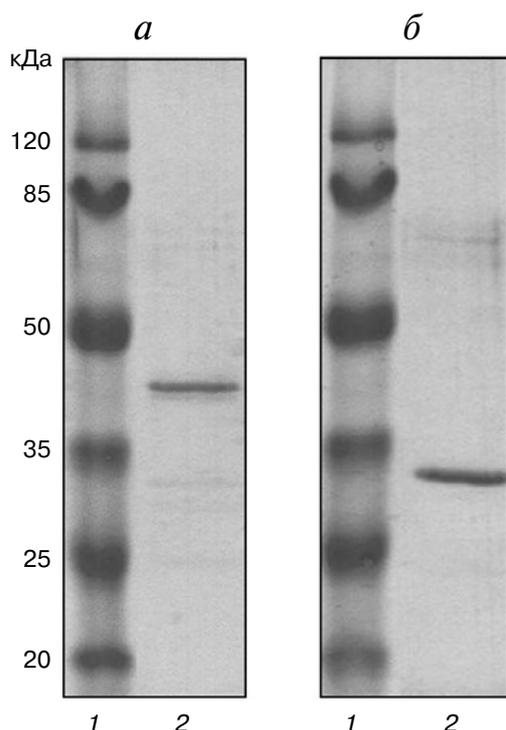


Рис. 5. Электрофореграммы очищенных эндогликоказ: 1 – стандартные маркеры для Ds-Na-ПААГ-электрофореза, 2 – очищенной EG2 42 кДа (а); 1 – стандартные маркеры для Ds-Na-ПААГ-электрофореза, 2 – очищенной LAM 31 кДа (б)

мент обладает высокой активностью по лишечану. На основе полученных результатов EG2 можно классифицировать как КФ 3.2.1.4. Ферменты данного класса могут расщеплять только (1,4)- β -гликозидные связи, как в полисахаридах, содержащих только (1,4)- β -гликозидные связи, так и в субстратах, содержащих одновременно как (1,4)- β -, так (1,3)- β -гликозидные связи (<http://www.brenda-enzymes.org/>).

Соотношение активностей, проявляемых LAM к различным субстратам (отсутствие активности по КМЦ, наличие активности по отношению к β -глюкану, ламинарину, лишечану и

Таблица 1. Компонентный состав ФП (в % от общего пула белка)

ФП	Компонент		
	EG2	LAM	прочие ферменты
C-537	3	–	97
EL-41	21	38	41
EL-49	31	23	46
EL-62	17	44	39

курдлану), позволяет классифицировать этот фермент как КФ 3.2.1.6. Ферменты данного класса могут расщеплять внутренние (1,3)- β -гликозидные связи, а также (1,4)- β -гликозидные связи в субстратах, содержащих одновременно как (1,4)- β -, так (1,3)- β -гликозидные связи. Однако гидролиз (1,4)- β -гликозидной, находящейся на восстанавливаемом конце остатка глюкозы, возможен только в случае, если данный остаток глюкозы невосстанавливающим концом соединен (1,3)- β -гликозидной связью (<http://www.brenda-enzymes.org/>).

Следует отметить, что оба фермента были не активны по отношению к ксилану, МКЦ и пНФГ.

pH- и температурные оптимумы активности очищенных EG2 и LAM. Установлено, что диапазоны оптимальных значений pH и температуры, а также значений $T_{50\%}$ и $pH_{50\%}$ (значений pH и T , при которых ФП проявлял более 50% максимальной β -глюкоказной активности) обоих исследуемых ферментов перекрывались (табл. 3).

В случае EG2 наибольшая активность наблюдалась при более низких значениях pH и более высоких температурах, чем в случае LAM.

Кинетические параметры гидролиза полисахаридных субстратов очищенными EG2 и LAM. Кинетические параметры (K_m , k_{cat}) были определе-

Таблица 2. Удельные активности (ед на 1 мг белка) очищенных эндогликоказ EG2 и LAM по отношению к различным субстратам (50°, pH 5,0)

Фермент	Удельная активность				
	по β -глюкану	по КМЦ	по ламинарину	по лишечану	по курдлану
EG2	75 ± 2	76 ± 1	0	94 ± 3	0
LAM	54,0 ± 0,4	0	15,2 ± 0,4	56 ± 1	5,3 ± 0,2

Таблица 3. pH- и температурные оптимумы действия очищенных EG2 и LAM

Фермент	pH-оптимум, 50° (pH _{50%})	T-оптимум, ° при pH 5,0 (T _{50%})
EG2	3,9–4,9 (3,4–5,6)	61–80 (32–85)
LAM	4,3–5,2 (3,8–6,0)	59–67 (45–70)

ны при использовании β-глюкана для EG2 и β-глюкана и ламинарина для LAM в качестве субстрата. Результаты приведены в табл. 4.

Как видно из полученных данных, EG2 являлась более эффективным ферментом при гидролизе β-глюкана за счет высокого значения k_{cat} . Для LAM в случае гидролиза ламинарина значения K_m в два раза меньше, чем в случае гидролиза β-глюкана, что указывает на большее сродство LAM к ламинарину. Однако k_{cat} в случае гидролиза β-глюкана LAM выше в четыре раза, что объясняет большую удельную активность LAM по отношению к β-глюкану, чем к ламинарину.

Состав продуктов исчерпывающего гидролиза полисахаридных субстратов очищенными EG2 и LAM. Глубина исчерпывающего гидролиза β-глюкана и ламинарина под действием LAM, определенная по выходу ВС, составила 20 и 40% соответственно. Меньший выход ВС в случае β-глюкана можно объяснить строением субстрата — содержание 1,3-β-гликозидных связей не превышает 36%, в ламинарине содержание 1,3-β-гликозидных достигает 90% [3, 15].

В случае гидролиза β-глюкана под действием EG2 глубина гидролиза достигала 10%, что, очевидно, отражает число доступных для действия EG2 гликозидных связей β-глюкана.

При гидролизе ламинарина на первой фазе процесса под действием LAM образуется ряд олигосахаридов со степенью полимеризации (СП) >8, которые затем на конечной фазе гидролиза конвертируются в глюкозу, ламинари-

биозу и ламинаритриозу (рис. 6, а, б). Глюкоза в качестве продукта была обнаружена после 3-х ч гидролиза (вероятно, глюкоза появляется в результате гидролиза олигосахаридов с СП 3–5), однако LAM была не способна гидролизовать ламинарибиозу (рис. 6, а, б). При гидролизе β-глюкана под действием LAM образовывалось более широкий набор олигосахаридов с различной СП (рис. 6, а, в), чем при гидролизе этим ферментом ламинарина. На конечных стадиях гидролиза наблюдается образование целлотриозы и олигосахаридов с СП < 5. В случае гидролиза LAM β-глюкана глюкоза в качестве продукта не была обнаружена.

При гидролизе β-глюкана EG2 на начальной фазе процесса наблюдалось образование ряда олигосахаридов, причем, в отличие от действия LAM, эти олигосахариды сохранялись до завершения процесса исчерпывающего гидролиза (рис. 6, а, г). Таким образом, EG2 и LAM позволяют получать ряд олигосахаридных продуктов гидролиза ламинарина и β-глюкана с СП, по крайней мере, до 10, т.е. данные ферменты могут быть использованы для получения глюкан-олигосахаридов для их использования в качестве пребиотиков [16].

Свойства ФП. Активность полученных рекомбинантных ФП была определена по отношению к растворимым (КМЦ, ламинарин, ксилан, β-глюкан) и нерастворимым (МКЦ) полисахаридным субстратам, а также по отношению к синтетическому субстрату (пНФГ). Полученные экспериментальные данные обобщены в табл. 5.

Как видно из табл. 5, КМЦ-азная активность ФП С-537, полученных с помощью рекомбинантных штаммов, была в 2,1–2,9 раз выше, β-глюканазная — в 2,9–3,6 раз выше, ламинариназная — в 1,6–2,5 раза выше, чем у ФП, полученного с помощью реципиентного штамма. Напротив, авицелазная активность (по МКЦ) ФП реципиентного штамма была в 1,8–2,5 раза, ксиланазная — в 2,5–3,4 раз выше, чем у ФП, полученных с помощью рекомбинантных штаммов. β-глюкозидазная активность (по пНФГ) всех изучаемых ФП была практически одинакова.

Таблица 4. Кинетические параметры гидролиза β-глюкана и ламинарина очищенными EG2 и LAM (pH 5,0; 50°)

Фермент	Субстрат	K_m , г/л	k_{cat} , 1/с	k_{cat}/K_m , л/(с · г)
EG2	β-глюкан	22,8 ± 0,2	152 ± 2	6,6 ± 0,1
LAM	β-глюкан	2,5 ± 0,1	49 ± 1	19,8 ± 0,7
	ламинарин	1,1 ± 0,1	11,9 ± 0,2	10,6 ± 0,4

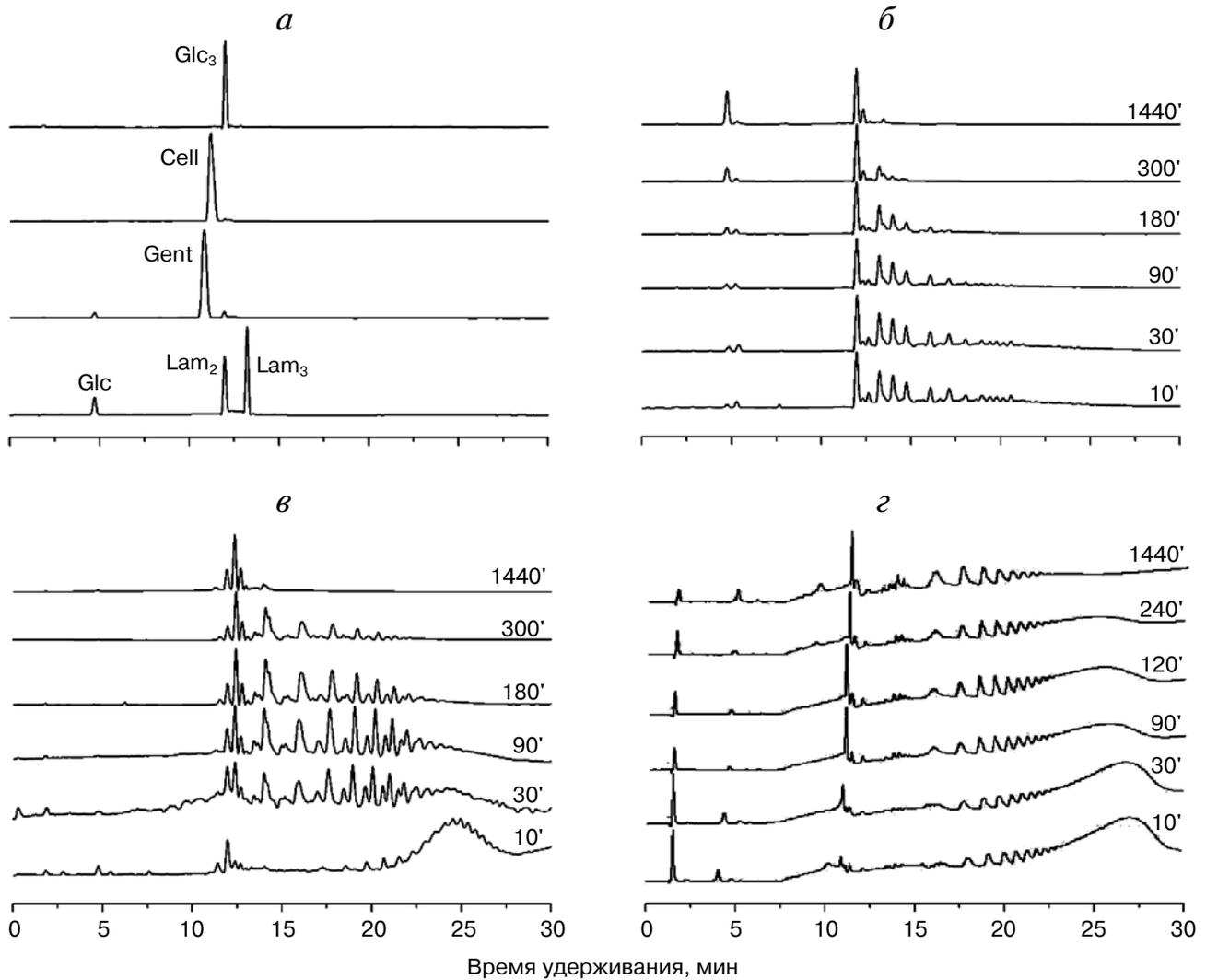


Рис. 6. Хроматографические профили: стандартов: Glc – глюкоза, Lam₂ – ламинарибиоза, Lam₃ – ламинаритриоза, Gent – гентибиоза, Cell – целлобиоза, Glc₃ – целлотриоза (а); продуктов гидролиза ламинарина (5 мг/мл) очищенной LAM по истечению 10, 30, 60, 90, 180, 300 и 1440 мин (б); продуктов гидролиза β-глюкана (5 мг/мл) очищенной LAM по истечению 10, 30, 60, 90, 180, 300 и 1440 мин (в); продуктов гидролиза β-глюкана (5 мг/мл) очищенной EG2 по истечению 10, 30, 60, 90, 120, 240 и 1440 мин (г)

Таблица 5. Активности (ед на 1 г препарата) и содержание белка (мг на 1 г препарата) в ФП, полученных с помощью рекомбинантных штаммов-продуцентов и реципиентного штамма *P. verrucosum* 537 Δ iaD⁻

ФП	Содержание белка, мг/г	Удельная активность					
		по МКЦ	по КМЦ	по β-глюкану	по ламинарину	по ксилану	по пНФГ
C-537	800 ± 20	560 ± 60	8100 ± 450	10 600 ± 860	3200 ± 200	16 200 ± 1600	550 ± 20
EL-41	620 ± 30	239 ± 6	17 000 ± 1200	30 900 ± 600	6700 ± 620	4700 ± 190	500 ± 19
EL-49	690 ± 10	314 ± 7	24 000 ± 2070	34 000 ± 2100	5200 ± 550	5100 ± 200	630 ± 28
EL-62	800 ± 50	300 ± 16	18 100 ± 800	38 000 ± 3200	8100 ± 800	6500 ± 160	620 ± 32

Температурные и рН-оптимумы, а также стабильность целевых активностей, являются важными параметрами для сравнения свойств ФП между собой, а также для выбора условий практического применения ФП в биотехнологических процессах. Поэтому было изучено влияние температуры и рН на β -глюканазную активность и стабильность сухих ФП, полученных на основе новых рекомбинантных штаммов-продуцентов *P. verruculosum*, а также на основе рецепиентного штамма. Для исследования был отобран ФП EL-62, поскольку он обладал повышенной активностью по β -глюкану относительно препаратов EL-41 и EL-49 (табл. 5). Полученные экспериментальные данные обобщены в табл. 6.

ФП EL-62 характеризовался более широким диапазоном оптимальных значений рН и Т, а также значений рН_{50%} и Т_{50%} по сравнению с ФП С-537 рецепиентного штамма. Особенностью ФП EL-62 являлось увеличение β -глюканазной активности в слабокислой области (рН ~5) в интервале температур 45–55°. Следует отметить, что температурный и рН-оптимумы β -глюканазной активности для очищенных ферментов (табл. 3), как и ожидалось, находятся в пределах температурного и рН-оптимума ФП (табл. 6).

Важным этапом современного кормопроизводства является процедура горячего прессования, так называемая «пеллетизация». Данный процесс происходит при повышенной температуре (около 80°) в течение 10–90 с [1]. Поэтому важной характеристикой ФП, предназначенных для кормопроизводства, является их термостабильность при указанной температуре. Из данных табл. 6 следует, что время полуинактивации β -глюканазной активности при 80° ФП EL-62 на порядок выше, чем в случае ФП С-537 рецепиентного штамма. Повышенная термостабильность рекомбинантного ФП EL-62 позволяет предполагать возможность его практического использования в технологических процессах кормопроизводства в качестве кормовой добавки.

Влияние ФП на вязкость цельнозернового экстракта ячменя. Для оценки эффективности ФП с точки зрения разрушения НПС зерна было исследовано влияние рекомбинантного ФП EL-62, обладающего максимальными активностями по β -глюкану и ламинарину (табл. 5), на приведенную вязкость водного экстракта ячменя. В качестве контроля использовали ФП С-537, полученного с помощью рецепиентного штамма, и три коммерческих ФП (ФП-1, ФП-2, ФП-3), используемых в качестве кормовых добавок: два

Таблица 6. рН- и температурные оптимумы и стабильность активности по β -глюкану для ФП, полученных с помощью рекомбинантного штамма-продуцента EL-62 и рецепиентного штамма *P. verruculosum* 537 niaD⁻

ФП	рН-оптимум, 50° (рН _{50%})	Т-оптимум, рН 5,0 (Т _{50%})	Время полуинактивации (рН 5,0), мин	
			50°	80°
С-537	3,5–4,5 (3,0–6,0)	66–74 (50–80)	>180	0,2
EL-62	3,5–5,7 (3,0–6,5)	42–70 (32–90)	>180	3

Таблица 7. Содержание белка (мг на 1 г препарата) и удельные активности (ед на 1 мг белка) ФП, использованных в прикладных испытаниях

ФП	Содержание белка, мг/мл	Удельная активность ФП		
		по КМЦ	по β -глюкану	по ксилану
С-537	800 ± 20	10 ± 1	13 ± 2	20 ± 2
ФП-1	155 ± 9	13,5 ± 0,8	9,8 ± 0,7	7,6 ± 0,3
ФП-2	110 ± 8	8,6 ± 0,5	5,1 ± 0,4	27 ± 2
ФП-3	189 ± 7	13,6 ± 0,7	25 ± 3	21 ± 2
EL-62	800 ± 50	23 ± 1	47 ± 4	8,1 ± 0,2

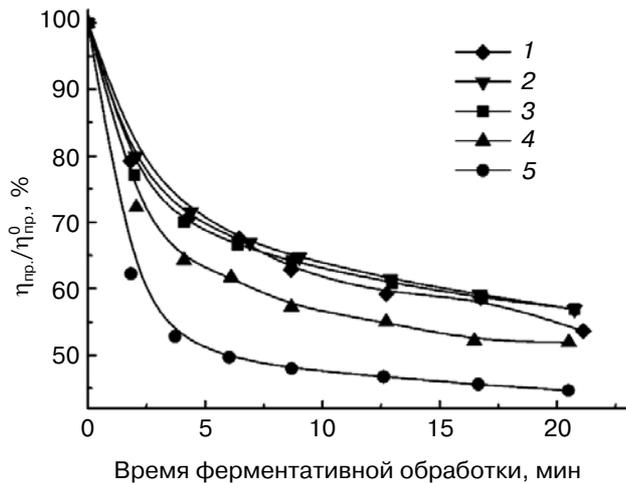


Рис. 7. Зависимость отношения приведенной вязкости экстракта ячменя (после добавления к ней ФП) от времени ферментативной обработки (дозировка ФП — 0,5 мг белка на 1 мл реакционной смеси). Цифрами обозначены кривые, соответствующие ФП: 1 — С-537, 2 — ФП-1, 3 — ФП-2, 4 — ФП-3, 5 — EL-62

из них получены на основе штамма-продуцента *Trichoderma longibrachiatum*, один (ФП-3) получен с помощью *P. funiculosum*. Характеристики

используемых ФП (содержание белка и удельные активности) представлены в табл. 7.

Испытания проводили при одинаковой дозировке ФП в реакционной среде (см. раздел «Методы исследования»). Результаты испытаний представлены на рис. 7.

Используемые коммерческие ФП по скорости уменьшения приведенной вязкости цельнозернового экстракта ячменя находятся на одном уровне с ФП С-537, полученного на основе штамма реципиента *P. verruculosum* 537 niaD⁻. В то же время ФП EL-62 оказался эффективнее остальных ФП и обеспечивал более быстрое и более существенное уменьшение приведенной вязкости экстракта, что делает ФП EL-62 (и другие полученные нами новые рекомбинантные ФП) перспективными для использования их в качестве кормовой добавки для разрушения НПС зерна.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 гг.» (идентификационный номер проекта RFMEFI60714X0050), а также с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования «Прикладные биотехнологии» ИНБИ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bedford, M., and Partridge, G. (2010) *Enzymes in farm animal nutrition*, CABI, UK.
- Bacic, A., Fincher, G., and Stone, B. (2009) *Chemistry, Biochemistry and Biology of (1–3)-β-Glucans and Related Polysaccharides*, Academic Press, N.Y.
- Holtekjolen, A.K., Uhlen, A.K., Brathen, E., Sahlstrom, S., and Knutsen, S.H. (2006) Contents of starch and non-starch polysaccharides in barley varieties of different origin, *Food Chem.*, **94**, 348–358.
- Aslanidis, C., and de Jong, P.J. (1990) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR), *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6069–6074.
- Синицын А.П., Рожкова А.М., Синицына О.А., Федорова Е.А., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Соколова Л.М., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Винецкий Ю.П., Черноглазов В.М., Зоров И.Н. (2010) Генетическая конструкция для обеспечения экспрессии целевых гомологичных и гетерологичных генов в клетках мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*, используемого в качестве хозяина, способ получения штамма гриба *Penicillium verruculosum* и способ получения ферментного препарата, *Государственный реестр изобретений Российской Федерации*, RU2378372 (С2).
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Peterson, G.L. (1979) Review of the folin phenol protein quantitation method of lowry, rosebrough, farr and randall, *Anal. Biochem.*, **100**, 201–220.
- Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. (1991) *Справочник биохимика*, Мир, Москва, с. 446.
- Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. (1990) *Методы изучения и свойства целлюлитических ферментов*, ВИНТИ, Москва.
- Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. (1995) *Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов*, Изд-во МГУ, Москва.
- James, P. (2001) *Proteome Research: Mass Spectrometry – Principles and Practice*, Springer Verlag, Heidelberg.
- Gusakov, A.V., Semenova, M.V., and Sinitsyn, A.P. (2010) Mass spectrometry in the study of extracellular enzymes produced by filamentous fungi, *J. Anal. Chem.*, **65**, 1446–1461.
- Vlasenko, E., Schulein, M., Cherry, J., and Xu, F. (2010) Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases, *Bioresour. Technol.*, **101**, 2405–2411.
- Morozova, V.V., Gusakov, A.V., Andrianov, R.M., Pravilnikov, A.G., Osipov, D.O., and Sinitsyn, A.P. (2010) Cellulases of *Penicillium verruculosum*, *Biotechnol. J.*, **5**, 871–880.
- Collins, H.M., Burton, R.A., Topping, D.L., Liao, M.L., Bacic, A., and Fincher, G.B. (2010) Variability in fine structures of noncellulosic cell wall polysaccharides from cereal grains: potential importance in human health and nutrition, *Cereal Chem.*, **87**, 272–282.
- Tymczyszyn, E.E., Santos, M.I., Costa, M.C., Illanes, A., and Gomez-Zavaglia, A. (2014) In *Carbohydrates Applications in Medicine* (Gil, M.H., ed.), Research Signpost, Kerala, pp. 127–154.

**PROPERTIES OF ENZYME PREPARATIONS
AND HOMOGENEOUS ENZYMES ENDOGLUCANASE EG2
Penicillium verruculosum AND ENDOGLUCANASE
LAM *Myceliophthora thermophila***

**D. A. Merzlov^{1*}, I. N. Zorov^{1,2}, G. S. Dotsenko²,
Y. A. Denisenko², A. M. Rozhkova², A. D. Satrutdinov²,
E. A. Rubtsova², E. G. Kondratieva², A. P. Sinitsyn^{1,2}**

¹ *M. V. Lomonosov Moscow State University, Department
of Chemistry, Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)932-8846,
E-mail: dmitriymerzlov@gmail.com*

² *A. N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy
of Sciences, Moscow 119071, Russia; fax: +7(495)954-2732,
E-mail: inbi@inbi.ras.ru*

Received November 25, 2014

Revision received December 30, 2014

The genes of endoglucanases EG2 (36,2 kDa) *Penicillium verruculosum* and LAM (30,8 kDa) *Myceliophthora thermophila* were cloned into *P. verruculosum* recombinant strain. New enzyme preparations with high stability of activity against barley β -glucan were obtained and investigated, and homogeneous enzymes EG2 (EC 3.2.1.4) and LAM (EC 3.2.1.6) were purified and characterized. The EG2 K_m value for β -glucan was found to be in 10 times higher than in the case LAM; nevertheless, EG2 demonstrated greater processivity due to its higher k_{cat} . The pH- and T-optima of EG2 and LAM activity against barley β -glucan overlapped and were 4.3-4.9 and 61-67°C, and EG2 was more stable than LAM. Oligosaccharides with 2-10 polymerization degree are formed as a result of hydrolysis of different β -glucans (barley β -glucan, laminarin) by the purified enzymes. It was found that the enzyme preparations were faster and more effective in decreasing the reduced viscosity of wholegrain barley extract than some commercial enzyme preparation. The new enzyme preparations seem to be very perspective supplementations for non-starch polysaccharide degradation in grain animal feed.

Key words: endoglucanase, β -glucan, enzyme preparations, *Penicillium verruculosum*, *Myceliophthora thermophila*