

УДК 577.152.321*52

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ β -D-ГЛЮКОЗИДАЗА МОРСКОГО ГРИБА *Penicillium canescens*

© 2012 г. Ю. В. Дубровская, В. В. Сова, Н. Н. Слинкина, С. Д. Анастюк,
М. В. Пивкин, Т. Н. Звягинцева

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток 690022, e-mail: sova@piboc.dvo.ru

Поступила в редакцию 25.10.2011 г.

Из морского гриба *Penicillium canescens* в гомогенном состоянии выделена внеклеточная β -D-глюкозидаза. Согласно данным ДДС-Na-электрофореза молекулярная масса фермента составляла 64 кДа, максимальная активность наблюдалась при pH 5.2 и 70°C. Глюкозидаза катализировала гидролиз β -гликозидных связей как в гликозидах, так и дисахаридах глюкозы и обладала трансгликозилирующей активностью. Фермент может быть использован для дегликозилирования природных гликозидов и в ферментативном синтезе новых углеводсодержащих соединений.

Ферменты β -D-глюкозидазы (КФ 3.2.1.21) гидролизуют O-гликозидные связи между остатком глюкозы и арильным или алкильным агликоном, либо β -D-глюкоолигосахариды. Эта группа ферментов играет важную роль в углеводном метаболизме и является ключевой в образовании глюкозы при использовании ее различными организмами как источника энергии и углерода. Гликозидазы найдены в растениях, животных, грибах и бактериях [1].

Гликозидазы применяются в различных биотехнологических процессах. Например, для ферментации соевого молока используют гликозидазы бифидобактерий. Известно, что изофлавоны сои предупреждают онкологические заболевания и атеросклероз, снимают симптомы менопаузы. Агликоны являются фармакологически активной частью гликозидов. Один из путей увеличения количества функциональных компонентов в сое – это ферментативное превращение изофлавонов из бионепригодной в биопригодную форму, т.е. гликозидов в агликоны [2].

Добавление β -D-глюкозидазы к препаратам целлюлазы для гидролиза целлюлозных или лигноцеллюлозных субстратов приводит к ускорению превращения целлобиозы в глюкозу. Обычно в коммерческих препаратах целлюлазы не хватает этого фермента, и накопление в продуктах конверсии целлобиозы приводит к ингибированию процесса [3].

Гликозидазы обладают высокой трансгликозилирующей активностью и применяются для ферментативного синтеза. Например, для гликозилирования первичных и вторичных спиртов и др. соединений [4].

Гликозидазы обладают специфичностью к типу связи, структуре агликона и углеводной компоненты гликозидов. Показано, что даже глико-

зидазы, найденные в одном источнике, имеют значительные отличия в субстратной специфичности. В грибах найдены гликозидазы с широкой специфичностью, которые действуют одинаково хорошо и на олигосахариды, и на арильные или алкильные гликозиды. Поэтому грибные гликозидазы более пригодны для использования как многоцелевые катализаторы, а исследования каталитических свойств грибных гликозидаз весьма актуальны [5]. Работы последних лет показали, что грибы из морских мест обитания являются продуцентами высоко активных, устойчивых к различным факторам ферментов, столь необходимых современной промышленности [6].

Цель работы – выделение и характеристика индивидуальной β -D-глюкозидазы, входящей в комплекс внеклеточных O-гликозилгидролаз морского гриба *Penicillium canescens* Sopp.

МЕТОДИКА

Микроорганизмы. Штамм морского гриба *Penicillium canescens* взят из коллекции морских микроорганизмов Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН (КММ ТИБОХ) и культивирован на модифицированной среде Тубаки, содержащей (г/л морской воды): ламинаран – 3.0, пептон – 1.0, KH_2PO_4 – 1.0, дрожжевой экстракт – 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, FeSO_4 – 0.02, pH 7.0.

Реагенты. Ламинаран из бурой водоросли *Saccharina cichorioides* и фукоидан из *Fucus evanescens* были выделены, согласно ранее описанному методу [7]. Пустулан, амилопектин, альгинат натрия, п-нитрофенил- β -D-ламинаритриозид, метил- β -D-глюкопиранозид, метил- α -D-глюко- и галактопиранозиды, ламинариолигосахариды – из коллекции лаборатории химии ферментов ТИБОХ. Халистанол сульфат из тропической губки

сем. Halihondriidae любезно предоставлен Т.Н. Макарьевой (ТИБОХ ДВО РАН). Коммерческие препараты: п-нитрофенильные производные сахаров, гентиобиоза, целлобиоза, мелибиоза – фирмы “Serva” (Германия), группоспецифические реагенты, носители для хроматографии, ПАВ и органические растворители – фирмы “Sigma” (США).

Аналитические методы. Концентрацию белка в растворах определяли методом Лоури [8], при хроматографии – по поглощению при 280 нм. Содержание восстанавливающих сахаров устанавливали методом Нельсона [9].

ДДС-Na-электрофорез проводили в 9–20%-ном полиакриламидном геле по методу Лэммли [10]. В качестве стандартных маркеров использовали рекомбинантные белки фирмы “Fermentas Ruler” (Европейский союз). Гель сканировали на денситометре GS-800, “Bio-Rad” (США).

Анализ продуктов ферментативного гидролиза (моно- и олигосахаридов) проводили с использованием колонки Zorbax-NH₂ (4.6 мм × 250 мм, Германия) на хроматографе Agilent 1100 Series (США). Элюировали смесью ацетонитрил – вода 60 : 20. Детектирование осуществляли с помощью рефрактометра.

Продукты, содержащие п-нитрофенильный радикал (НФ), анализировали на колонке Zorbax SB-C₈ (4.6 мм × 150 мм, Германия) с обращенной фазой. Элюирование вели в градиенте ацетонитрил – вода от 0 до 80% ацетонитрила со скоростью 1 мл/мин. Обнаружение продуктов проводили с помощью УФ-детектора фирмы “Agilent Technologies” (США) при длине волны 302 нм.

Масс-спектры продуктов реакции трансгликозилирования записывали на времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex-III (“Bruker”, Германия) с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ). В качестве МАЛДИ матрицы использовали 1 М раствор 2,5-дигидроксibenзойной кислоты в системе ацетонитрил-вода (1 : 1). Раствор исследуемых образцов (~1 мг/мл) в объеме 1 мкл наносили на мишень, предварительно покрытую матрицей, и высушивали в потоке воздуха. Спектры были получены в режиме рефлектора.

Определение активности ферментов. Для определения активности гликаназ стандартная реакционная смесь содержала 50 мкл раствора фермента и 450 мкл раствора полисахарида (1 мг/мл) в 0.05 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.2. Время инкубации от 15 до 60 мин при 37°C. Активность фермента определяли по возрастанию количества восстанавливающих сахаров методом Нельсона [9]. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует образование 1 нмоль моносахарида (глюкоза как стандарт) за 1 мин в условиях определения.

Активность β -D-глюкозидазы и N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы определяли с использованием в качестве субстратов п-нитрофенильных производных соответствующих сахаров [11]. Реакционная смесь содержала 50 мкл раствора фермента и 100 мкл раствора субстрата (1 мг/мл) в 0.05 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.2. Время инкубации от 15 до 60 мин при 37°C, реакцию останавливали добавлением 150 мкл 1 М Na₂CO₃. Оптическую плотность измеряли при 420 нм на микропланшетном спектрофотометре BioTek, “Biotek Instruments, INC” (США). За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует образование 1 нмоль п-нитрофенола за 1 мин в условиях определения.

Выделение и очистка β -D-глюкозидазы из культуральной жидкости *P. canescens*. Культуральную жидкость морского мицелиального гриба *P. canescens* отделяли от мицелия центрифугированием при 10.400 g в течение 10 мин. Культуральный фильтрат концентрировали методом ультрафильтрации на мембране PM-10 фирмы “Amicon” (Голландия). Фильтрат наносили на колонку с Sephacryl S-300 (фирма “GE Health Care”, США), уравновешенную 0.05 М натрий-ацетатным буфером, pH 5.2 (рабочий буфер). Элюирование проводили тем же буфером со скоростью 0.4 мл/мин. Объем фракций составлял 3.5 мл. Фракции, содержащие β -D-глюкозидазу, объединяли и концентрировали методом ультрафильтрации. Препарат наносили на Econo-Pac Q картридж (ДЭАЭ-целлюлоза) фирмы “Bio-Rad” (США), уравновешенный рабочим буфером, и подключенный к прибору АКТА FPLC, “Amersham pharmacia biotech” (Швеция). Элюирование проводили в линейном градиенте концентрации NaCl в рабочем буфере (0–0.4 М, общий объем 180 мл) со скоростью 2 мл/мин. Фракции (объем 1 мл), проявившие активность, объединяли, концентрировали ультрафильтрацией, диализовали против рабочего буфера и наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой Macro Prep Support (2.0 × 18.5 см), уравновешенную рабочим буфером. Элюирование проводили в линейном градиенте концентрации NaCl в рабочем буфере (0–0.3 М, общий объем 400 мл) со скоростью 0.25 мл/мин. Фракции (объем 2 мл), в которых обнаружилась активность β -D-глюкозидазы, объединяли и концентрировали ультрафильтрацией.

Далее препарат хроматографировали с помощью системы FPLC на колонке с Superose 12HR 10/30 (1.0 см × 30 см) (фирма “GE Health Care”, США), уравновешенной рабочим буфером, содержащим 0.15 М NaCl. Фракции (объем 0.5 мл), в которых обнаружилась активность β -D-глюкозидазы, объединяли и концентрировали до 5 мл ультрафильтрацией.

Оптимальный pH. Реакционную смесь, содержащую 25 мкл раствора β -D-глюкозидазы (2×10^{-2} ед.), 50 мкл 0.1 М цитрат-фосфатного буфера с различными значениями pH (от 3.4 до 7.2) и 75 мкл раствора п-нитрофенил- β -D-глюкопиранозида (1 мг/мл в воде), инкубировали в течение 15 мин при 37°C и определяли активность по образованию п-нитрофенола, как описано выше.

Стабильность pH. К 25 мкл раствора фермента (2×10^{-2} ед.) добавляли 50 мкл 0.1 М цитрат-фосфатного буфера с различными значениями pH (от 3.4 до 7.0). Растворы выдерживали при комнатной температуре 30 мин и добавляли 75 мкл раствора субстрата (1 мг/мл), растворенного в 0.2 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.2, инкубировали в течение 10 мин при 37°C и определяли в пробах остаточную активность.

Температурный оптимум. Реакционную смесь, содержащую 25 мкл раствора фермента (2×10^{-2} ед.) и 125 мкл раствора субстрата (1 мг/мл) в 0.05 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.2, инкубировали в течение 15 мин при различной температуре (от 5 до 70°C) и определяли активность по образованию п-нитрофенола.

Термостабильность. Пробы, содержащие по 25 мкл раствора фермента (2×10^{-2} ед.), выдерживали в течение 15 мин при различной температуре (от 5 до 70°C). В охлажденные пробы затем добавляли 125 мкл раствора субстрата (1 мг/мл) в 0.05 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.2, инкубировали в течение 15 мин при 37°C и определяли в пробах остаточную активность.

Влияние различных химических веществ. К 25 мкл фермента (2×10^{-2} ед.) добавляли 50 мкл раствора химических веществ (соли, природные ингибиторы, группоспецифические реагенты, моносахариды) необходимой концентрации. Смесь выдерживали 10 мин при комнатной температуре, добавляли 75 мкл раствора субстрата (1 мг/мл) в 0.05 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.2, инкубировали 15 мин при 37°C и определяли в пробах остаточную активность.

Определение константы Михаэлиса. Константа Михаэлиса (K_M) для гидролиза п-нитрофенил- β -D-глюкопиранозида была рассчитана по методу Лайнуивера и Берка [12]. Измеряли начальные скорости гидролиза субстрата β -D-глюкозидазой, как описано выше.

Определение молекулярной массы методом гель-фильтрации. Молекулярную массу (ММ) ферментов определяли методом гель-фильтрации на колонке Superose 12HR 10/30 (1.0 см \times 30 см) (фирма "GE Health Care", США). Для калибровки были использованы стандартные белки (кДа): витамин B₁₂ – 1.35, миоглобин – 17, яичный альбумин – 44, БСА – 68, γ -глобулин – 158, тирроглобулин – 670. Выход стандартных белков фиксировали по

поглощению при 280 нм, β -D-глюкозидазы из *P. canescens* – по ферментативной активности.

Трансгликозилирование. К 50 мкл раствора п-нитрофенил- β -D-глюкопиранозида или целлобиозы (1 мг/мл) добавляли 25 мкл фермента (2×10^{-2} ед.) и 25 мкл глицерина (конечная концентрация 5%). Инкубировали при 37°C. Через определенные промежутки времени (1, 3, 5, 10 мин) отбирали по 25 мкл и анализировали продукты методом МАЛДИ масс-спектрометрии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что уровень продуцирования ферментов микроорганизмами в значительной степени зависит от источника углерода в питательной среде [13, 14]. Глюкоза и некоторые легко усвояемые источники углерода могут быть причиной торможения синтеза гидролаз, а трудно усвояемые источники питания являются эффективными индукторами биосинтеза. Ранее для культивирования 8 штаммов морских грибов, в том числе и *P. canescens*, в качестве источника углерода нами были использованы различные полисахариды водорослей: агар, фукоидан, ламинаран [15]. Нейтральный глюкан ламинаран оказался наилучшим индуктором биосинтеза внеклеточных O-гликозилгидролаз для всех штаммов. При культивировании *P. canescens* на питательной среде с ламинараном в культуральной жидкости были обнаружены следующие O-гликозилгидролазы: 1,3- β -D-глюканаза (2.33 ед./мл), амилаза (2.63 ед./мл), пестуланаза (0.41 ед./мл), альгиназа (1.86 ед./мл), фукоидан-гидролаза (0.9 ед./мл), N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза (3.35 ед./мл), β -D-глюкозидаза (1.86 ед./мл).

Разработана схема выделения индивидуальной β -D-глюкозидазы из культуральной жидкости морского гриба *P. canescens*, которая включала комбинацию методов ультрафильтрации, гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Высокоочищенная β -D-глюкозидаза была получена со степенью очистки в 121 раз и выходом 4% (табл. 1). Согласно данным ДДС-Na-электрофореза, молекулярная масса β -D-глюкозидазы соответствовала 64 кДа. Молекулы β -D-глюкозидазы, вероятно, в растворе склонны к агрегированию, так как значение молекулярной массы, полученное методом гель-фильтрации, составляло около 178 кДа (рис. 1).

Максимальная активность β -D-глюкозидазы наблюдалась при pH 5.2 и 70°C. Такое же высокое значение температурного оптимума определено у β -глюкозидазы из базидиомицета *Fomitopsis palustris* [16]; β -D-глюкозидаза из *P. canescens* была стабильна в интервале pH от 5.0 до 7.0 и до температуры 50°C (рис. 2). K_M для гидролиза п-нитрофенил- β -D-глюкопиранозида была рассчитана по

Таблица 1. Очистка β -D-глюкозидазы из *P. canescens*

Стадия очистки	Общее содержание белка, мг	Общее количество единиц активности	Выход, %	Удельная активность, ед./мг белка	Степень очистки, раз
Культуральная жидкость	950	1055	100	1.1	1
Ультрафильтрация	60	400	38	6.7	6
Гель-фильтрация на Sepharyl S-300	13.7	230	22	16.8	15
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе Econo-Pac Q картридж	2.7	110	10	40.7	37
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе Macro Prep Support	0.8	60	6	75	68
Гель-фильтрация на Superose 12HR	0.3	40	4	133.3	121

методу Лайнуивера и Берка и имела значение 0.11 мМ, что является характерной величиной для ряда β -D-глюкозидаз из различных источников. Показано, что глюкоза, которая является продуктом реакции гидролиза, ингибирует активность β -D-глюкозидазы (на 50% при концентрации моносахарида 5 мМ).

Исследования субстратной специфичности β -D-глюкозидазы из *P. canescens* методом ВЭЖХ показали, что фермент катализирует гидролиз

β -гликозидных связей как в гликозидах (п-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид, метил- β -D-глюкопиранозид), так и дисахаридах глюкозы (гентиобиоза, целлобиоза); β -D-глюкозидаза не гидролизовала п-нитрофенил- β -D-галактопиранозид, метил- α -D-глюкопиранозид, метил- α -D-галактопиранозид и мелибиозу – дисахарид, содержащий остатки глюкозы и галактозы, связанные α -1 \rightarrow 6-связями. Следовательно, β -D-глюкозидаза из *P. canescens* обладает абсолютной

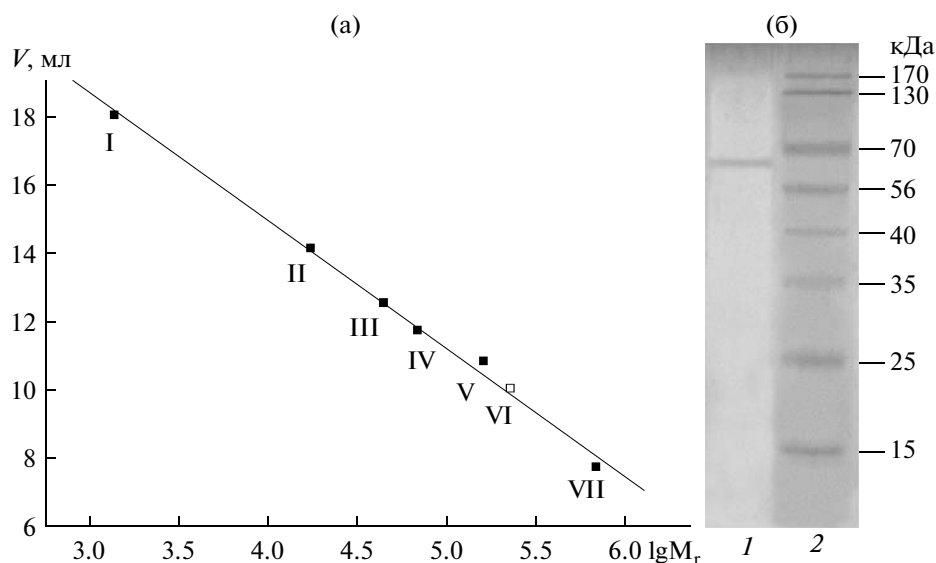


Рис. 1. Определение молекулярной массы β -D-глюкозидазы из *P. canescens* гель-фильтрацией на колонке с Superose 12 HR (кДа): I – витамин B₁₂ 1.35, II – миоглобин 17, III – яичный альбумин 44, IV – БСА 68, V – γ -глобулин 158, VI – β -D-глюкозидаза 178, VII – тиреоглобулин 670 (а), и ДДС-Na-электрофорезом: 1 – β -D-глюкозидаза, 2 – маркеры (б).

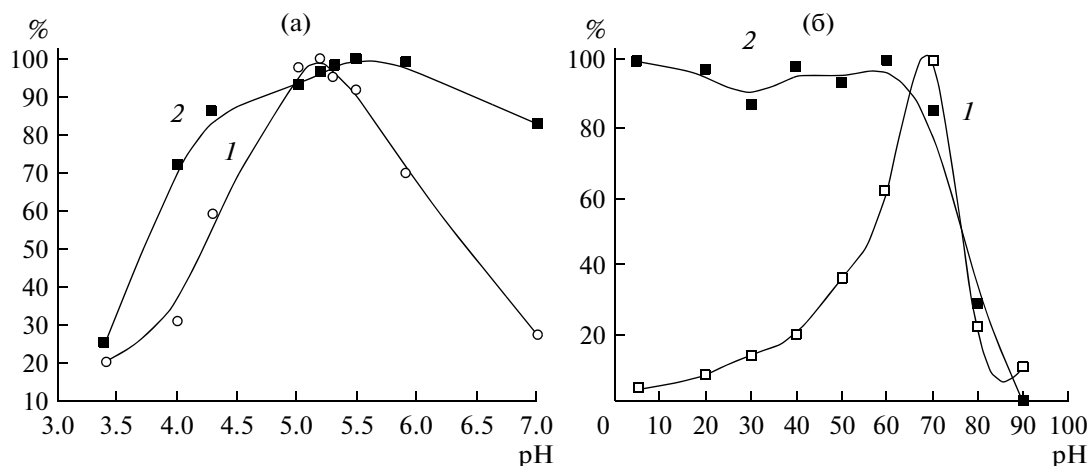


Рис. 2. Влияние pH (а) и температуры (б) на активность (%) β -D-глюкозидазы из *P. canescens*: 1 – оптимум, 2 – стабильность.

специфичностью к моносахаридному остатку (глюкоза) и конфигурации расщепляемой связи (β -конфигурация). Подобной специфичностью обладала β -D-глюкозидаза из морской термофильной бактерии *Thermotoga neapolitana* [17]. Исследуемая нами β -D-глюкозидаза проявляла характерное для ферментов этого класса предпочтение к более коротким субстратам. Ламинариолигосахариды с высокой степенью полимеризации (табл. 2) не являлись субстратами для β -D-глюкозидазы из *P. canescens*, лишь небольшие количества п-нитрофенола были обнаружены при действии фермента на п-нитрофенильное производное ламинаритрисахарида. Изучаемая β -D-глюкозидаза обладала широкой специфичностью

к структуре агликона в гликозидах, что позволило успешно использовать ее для дегликозилирования суммарной фракции изофлавоноидов, полученной из клеточной культуры лекарственного растения *Maackia amurensis*. Большую часть этих изофлавоноидов составляли глюкозиды и малонилглюкозиды изофлавонов [18].

Важным свойством некоторых β -D-глюкозидаз является способность катализировать реакцию трансгликозилирования, которая используется в ферментативном синтезе для гликозилирования первичных и вторичных спиртов и других соединений. При изучении способности β -D-глюкозидазы из *P. canescens* к трансгликозилированию применялась двухкомпонентная смесь, со-

Таблица 2. Специфичность β -D-глюкозидазы из *P. canescens*

Субстрат	Продукты реакции, идентифицированные ВЭЖХ	Способ обнаружения
п-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид	п-нитрофенол	УФ-детектор, 302 нм
п-нитрофенил- β -D-галактопиранозид	Не обнаружены	УФ-детектор, 302 нм
Метил- β -D-глюкопиранозид	Глюкоза	Рефрактометр
Метил- α -D-глюкопиранозид	Не обнаружены	»
Метил- α -D-галактопиранозид	Не обнаружены	»
п-нитрофенил- β -D-ламинаритриозид	Следовые количества п-нитрофенола	УФ-детектор, 302 нм
Целлобиоза	Глюкоза	Рефрактометр
Гентиобиоза	Глюкоза	»
Мелибиоза	Не обнаружены	»
Ламинариолигосахариды ($2 \leq n \leq 4$)	»	»
Ламинариолигосахариды ($5 \leq n \leq 10$)	»	»

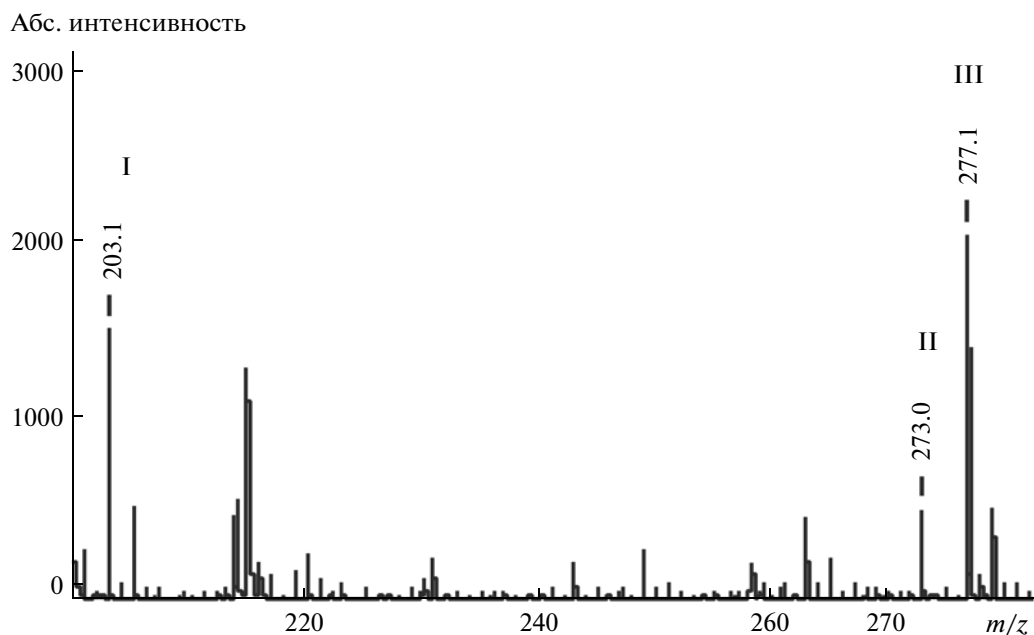


Рис. 3. МАЛДИ масс-спектр продуктов реакции трансгликозилирования β -D-глюкозидазой из *P. canescens*. Время реакции 1 мин. I – глюкоза (m/z 203.1), II – 2,5-дигидроксibenзойная кислота (матрица, m/z 273.0), III – продукт реакции трансгликозилирования – глицерилглюкозид (m/z 277.1).

стоящая из п-нитрофенил- β -D-глюкопиранозида или целлобиозы в качестве доноров углеводов и глицерина как акцептора. Анализ продуктов реакции проводили методом МАЛДИ масс-спек-

трометрии. Фермент обладал высокой трансгликозилирующей активностью. При использовании в качестве донора п-нитрофенил- β -D-глюкопиранозида с первых минут присутствовал продукт

Таблица 3. Влияние группспецифических реагентов и ионов металлов на активность β -D-глюкозидазы из *P. canescens*

Реагент	Группа (остаток)	Концентрация, М	Остаточная активность, %
п-хлормеркурибензоат натрия	–SH	10^{-2}	104
N-этилмалеимид	–SH	10^{-2}	103
Ацетилимидазол	Тир, Гис	10^{-2}	79
Диэтилпирокарбонат	Гис	10^{-2}	93
N-бромсукцинимид	Три	10^{-3}	0
N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид	–COOH	10^{-2}	65
N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид и бутиламин	–COOH	10^{-2}	5
Бутиламин (контрольный опыт)		10^{-2}	78
ЭДТА	Ионы металлов	10^{-2}	99
Азид натрия	Ионы металлов	10^{-2}	100
CaCl ₂	–	10^{-3}	98
MnCl ₂	–	10^{-3}	93
MgCl ₂	–	10^{-3}	84
CuSO ₄	–	10^{-3}	10
SnCl ₂	–	10^{-3}	6
AgNO ₃	–	10^{-3}	0

реакции трансгликозилирования – глицерилглюкозид с m/z 277.1 (рис. 3). С целлобиозой продукты трансгликозилирования обнаружены не были. Ранее было показано, что в реакции алкилгликозидного синтеза, катализируемой β -D-глюкозидазой из маниоки, в качестве донора может быть использован только *p*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид. Моно- и дисахариды в роли донора углеводной составляющей оказались непригодны [19].

Роль отдельных функциональных групп для каталитической активности β -D-глюкозидазы мы оценили методом ингибиторного анализа (табл. 3). Показано, что избирательные реагенты на сульфгидрильную группу (*p*-хлормеркурибензоат и *N*-этилмалеимид) не оказывали влияния на активность β -D-глюкозидазы. Ацетилимидазол, взаимодействующий с остатками тирозина и гистидина, вызывал ингибирование фермента на 21%. Вероятно, это связано с модификацией остатка тирозина, так как более специфичный реагент на гистидин – диэтилпирокарбонат практически не влиял на активность фермента. *N*-бромсукцинимид, избирательно окисляющий остатки триптофана в слабо кислой среде, полностью инактивировал фермент. Этот факт позволяет предположить важную роль остатков триптофана для каталитической активности β -D-глюкозидазы. Показано, что у некоторых *O*-гликозилгидролаз остатки триптофана расположены в центре связывания субстрата [20]. Карбоксильные группы дикарбоновых кислот, по-видимому, так же существенны для активности β -D-глюкозидазы. Карбодиимид на 45% понижал активность этого фермента, а его действие в присутствии нуклеофильного агента (бутиламин) приводило практически к полной потере активности. Ионы Ca^{2+} , Mn^{2+} не влияли на активность фермента, ионы Mg^{2+} незначительно ее понижали, а ионы Cu^{2+} , Sn^{2+} и Ag^{+} эффективно ингибировали ферментативную активность. По-видимому, металлы не входят в активный центр β -D-глюкозидазы из *P. canescens*, так как ЭДТА и азид натрия, ингибирующие металлозависимые ферменты, не изменяли активность β -D-глюкозидазы. Таким образом, можно предположить, что остатки триптофана и дикарбоновых кислот важны для активности β -D-глюкозидазы.

Известно, что ферменты морских грибов обладают повышенной устойчивостью к различным воздействиям. По-видимому, это связано с условиями обитания морских организмов и влиянием на их ферментные системы таких специфических факторов, как высокая концентрация солей, гидростатическое давление, рН среды, колебания температуры, относительная гипоксия и др. В растворах NaCl β -D-глюкозидаза из *P. canescens* сохраняла активность до концентрации соли 3 М. Не изменялась активность фермента в 50%-ных

растворах ПАВ (полиэтиленгликоль монолаурат 500 и полиэтиленгликоль 15 000). Только на 50% инактивировалась β -D-глюкозидаза в 40%-ном растворе этанола. Было проверено влияние на активность β -D-глюкозидазы известных природных ингибиторов *O*-гликозилгидролаз. Халистанол сульфат – полиоксистероид из тропической губки сем. Halihondriidae, необратимый ингибитор эндо-1,3- β -D-глюканаз [21], в концентрации 3×10^{-2} М понижал активность β -D-глюкозидазы из *P. canescens* на 25%. Практически полное ингибирование исследуемой β -D-глюкозидазы (остаточная активность 4% при концентрации ингибитора 10^{-10} М) наблюдалось лишь при действии природного алкалоида кастаноспермина, известного, как высоко специфичный ингибитор гликозидаз [22].

Таким образом, из морского гриба *P. canescens* в гомогенном состоянии выделена устойчивая к денатурации β -D-глюкозидаза, которая катализирует гидролиз β -гликозидных связей как в гликозидах, так и дисахаридах глюкозы и обладает трансгликозилирующей активностью. Фермент может быть использован для дегликозилирования природных гликозидов и в ферментативном синтезе новых углеводсодержащих соединений.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №11-04-98514, № 11-04-00772 и № 09-04-00761, ДВО РАН, Программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scigelova M., Singh S., Crout D.H.G. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 1999. V. 6. № 5. P. 483–494.
2. Yang S.Q., Wang L.J., Yan Q.J., Jiang Z.Q., Li L.T. // Food Chemistry. 2009. V. 115. № 4. P. 1247–1252.
3. Tu M.B., Zhang X., Kurabi A., Gilkes N., Mabee W., Saddler J. // Biotechnol. Lett. 2006. V.28. № 3. P. 151–156.
4. Wang R.J., Yang X.Y., Gao R.J., Yang Y., Wang X.J., Cao S.G. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2009. V. 56. № 2–3. P. 131–135.
5. Woodward J., Wiseman A. // Enzyme Microbial. Technol. 1982. V. 4. № 2. P. 73–79.
6. Пивкин М.В., Кузнецова Т.А., Сова В.В. Морские грибы и их метаболиты. Владивосток: Дальнаука, 2006. 248 с.
7. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Popivnich I.B., Isakov V.V., Scobun A.S., Sundukova E.V., Elyakova L.A. // Carbohydr. Res. 1999. V. 322. № 1–2. P. 32–39.
8. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
9. Nelson N. // J. Biol. Chem. 1944. V. 153. № 1. P. 375–381.
10. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 257. P. 680–685.
11. Ait N., Creuzt N., Cattaneo J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979. V. 90. № 2. P. 537–546.

12. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. Т. 3. 906 с.
13. Pitson S.M., Seviour R.J., Mcdougall B.M. // Can. J. Microbiol. 1997. V. 43. № 5. P. 432–439.
14. Noronha E.F., Kipnis A., Junqueira-Kipnis A.P., Ullhoa C.J. // FEMS Microbiol. Lett. 2000. V. 188. № 1. P. 19–22.
15. Бурцева Ю.В., Сова В.В., Пивкин М.В., Анастюк С.Д., Горбач В.И., Звягинцева Т.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 6. С. 700–708.
16. Yoon J.J., Kim K.Y., Cha C.J. // J. Microbiol. 2008. V. 46. № 1. P. 51–55.
17. Park T.H., Choi K.W., Park C.S., Lee S.B., Kang H.Y., Shon K.J., Park J.S., Cha J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. V. 69. № 4. P. 411–422.
18. Кусайкин М.И., Захаренко А.М., Ермакова С.П., Веселова М.В., Григорук Е.В., Федорев С.А., Звягинцева Т.Н. // Химия природ. соедин. 2011. № 2. С. 182–185.
19. Svasti J., Phongsak T., Sarnthima R. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. V. 305. № 3. P. 470–475.
20. Ding S.-J., Ge W., Buswell J.A. // Eur. J. Biochem. 2001. V. 268. № 22. P. 5687–5695.
21. Бакунина И.Ю., Сова В.В., Елякова Л.А., Макарьева Т.Н., Стоник В.А., Пермяков Е.А., Емельяненко В.И. // Биохимия. 1991. Т. 56. № 8. С. 1397–1405.
22. Gravier-Pelletier C., Maton W., Bertho G., Merrer Y.L. // Tetrahedron. 2003. V. 59. P. 8721–8730.

Extracellular β -D-Glucosidase of the *Penicillium canescens* Marine Fungus

Yu. V. Dubrovskaya, V. V. Sova, N. N. Slinkina, S. D. Anastyuk,
M. V. Pivkin, and T. N. Zvyagintseva

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Far Eastern Branch,
Vladivostok, 690022 Russia*

e-mail: sova@piboc.dvo.ru

Received October 25, 2011

Abstract—Extracellular β -D-glucosidase was isolated in a homogeneous state from the *Penicillium canescens* marine fungus. According to SDS-electrophoresis, the molecular weight of the enzyme was 64 kDa and the maximal activity was observed at pH 5.2 and 70°C. Glucosidase catalyzed the hydrolysis of β -glycosidic bonds both in glycosides and in glucose disaccharides and had transglycosylation activity. The enzyme can be used for the deglycosylation of natural glycosides and in enzymatic synthesis of new carbon-containing compounds.