

УДК 577.15

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЭНДО-1,4-β-ГЛЮКАНАЗЫ II И ЕЕ ХИМЕРНОЙ ФОРМЫ С ЦЕЛЛЮЛОЗОСВЯЗЫВАЮЩИМ МОДУЛЕМ

О.Г. Короткова¹, М.В. Семенова¹, Е.А. Рубцова¹, О.А. Сеницына²,
Е.Г. Кондратьева¹, Н.М. Бибииков³, А.М. Рожкова^{1*}, А.П. Сеницын^{1,2}

(¹Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук; ²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет; ³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет; *e-mail: amrojko@mail.ru)

Методами генетической инженерии получена химерная форма эндо-1,4-β-глюканазы II (ЭГII) *Penicillium verruculosum*, к С-концу которой присоединен целлюлозосвязывающий модуль (ЦСМ) целлобиогидролазы I *P. verruculosum* (ген *egII* не имеет участка, кодирующего ЦСМ). Были изучены свойства полученного химерного фермента, выделенного в гомогенной форме. Присоединение ЦСМ привело к существенному увеличению активности химерного фермента по отношению к микрокристаллической целлюлозе (МКЦ), а также к «появлению» его адсорбционной способности по отношению к целлюлозе, однако присоединение ЦСМ вызвало уменьшение активности по отношению к растворимым полисахаридным субстратам (карбоксиметилцеллюлозе и β-глюкану). Наличие ЦСМ позволило химерной форме фермента в составе целлюлазного комплекса более эффективно гидролизовать целлюлозосодержащие субстраты и увеличить выход продуктов. Прирост восстанавливающих сахаров (ВС) в случае гидролиза МКЦ в течение 24 ч целлюлазным комплексом, содержащим целлобиогидролазу I, β-глюкозидазу и ЭГII-ЦСМ, по сравнению с комплексом, в состав которого входила ЭГII без ЦСМ, составил 22%, для измельченной осинового древесины увеличение выхода ВС составило 42%.

Ключевые слова: эндо-1,4-β-глюканаза, целлюлазный комплекс, целлюлозосвязывающий модуль, гидролиз, *Penicillium verruculosum*.

Одно из важных направлений биотехнологии – биоконверсия возобновляемого целлюлозосодержащего сырья в простые сахара, которые далее превращают в коммерчески значимые продукты, такие как спирты, органические кислоты, углеводороды, простые и сложные эфиры и т.д. [1]. Конверсия целлюлозы происходит под действием комплекса целлюлолитических ферментов, в состав которого входят экзо-1,4-β-глюканазы (целлобиогидролазы, ЦБГ, КФ 3.2.1.91), эндо-1,4-β-глюканазы (эндоглюканазы, ЭГ, КФ 3.2.1.4) и β-глюкозидазы (БГЛ, КФ 3.2.1.74). Целлобиогидролазы катализируют деструкцию кристаллических участков целлюлозы, последовательно (по процессивному механизму) отщепляя целлобиозу от концов полисахаридной цепи. Эндоглюканазы катализируют гидролиз аморфных участков целлюлозы, расщепляя по неупорядоченному механизму внутренние 1,4-β-глюкозидные связи, снижая тем самым степень полимеризации субстрата и создавая новые сайты для действия

целлобиогидролаз. β-Глюкозидазы гидролизуют целлобиозу и целлолигосахариды до конечного продукта – глюкозы [2, 3]. Эффективность гидролиза целлюлозы зависит от состава ферментного комплекса и свойств, входящих в него компонентов. В частности, важную роль в гидролизе целлюлозы играет ЦБГ, имеющая целлюлозосвязывающий модуль (ЦСМ), который определяет высокое сродство ЦБГ к МКЦ и обеспечивает высокую эффективность деструкции субстрата этим ферментом [4–6].

Ранее [7] мы показали, что ЭГII, продуцируемая грибом *Penicillium verruculosum*, обладает высокой активностью по отношению к растворимым полисахаридным субстратам, таким как карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) и β-глюкан, однако ее активность по отношению к нерастворимой целлюлозе мала, что может быть обусловлено отсутствием ЦСМ в составе ЭГII (ген *egII* не имеет участка, кодирующего ЦСМ). Поэтому увеличение активности ЭГII к нерастворимой целлюлозе за счет присоединения к каталитическому кору

этого фермента ЦСМ является актуальной задачей, представляющей интерес с точки зрения практической реализации процессов биоконверсии целлюлозы и целлюлозосодержащего сырья.

Цель работы – модификация ЭГП *P. verruculosum* посредством присоединения к ней ЦСМ ЦБГП *P. verruculosum*, изучение биохимических и каталитических свойств полученной химерной формы фермента, а также анализ ее гидролитической способности.

Материалы и методы

Получение химерной формы фермента.

Первый шаг в получении химерной формы фермента заключался в получении генетической конструкции для трансформации реципиентного штамма *P. canescens* RN3-11-7. Для этого амплифицировали ген *eglIII* и кодирующий ЦСМ участок гена *cbhI^{cbd}* путем проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием геномной ДНК *P. verruculosum*, выделенной с помощью набора Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN, США) в качестве матрицы и набора синтетических олигонуклеотидов (табл. 1). В обоих экспериментах использовали Long PCR mix (LPM-полимераза, «ThermoScientific», США). Осуществлены 15 циклов ПЦР с соблюдением определенных условий: первичную денатурацию проводили при 95 °С (3 мин), денатурацию в цикле – при 95 °С (1 мин), отжиг праймеров – при 50 °С (1 мин), синтез полинуклеотидной цепи – при 68 °С (1 мин). Полученные ПЦР-продукты выделяли из агарозного геля с помощью набора QiAquick Gel Extraction Kit («QIAGEN», США). Выделенные из геля фрагменты длиной 1316 и 189 п.о., взятые соответственно в количестве 5 и 25 нг, смешивали и проводили ПЦР, используя олигонуклеотиды EGII-UpL, CBHI-LowL и LPM-полимеразу («ThermoScientific», США). Условия проведения ПЦР в этом случае были следующие:

первичная денатурация – 95 °С (30 с), денатурация в цикле – 95 °С (15 с), отжиг праймеров – 50 °С (1 мин), синтез полинуклеотидной цепи – 68 °С (1,5 мин). Проведено 20 циклов.

Полученный амплификат размером 1505 п.о., соответствующий химерной конструкции *eglIII-cbhI^{cbd}*, клонировали в вектор PC1 [8] по методике независимого лигирования, описанной в [9]. Полученные плазмиды серии pPC1-СНІМ выделяли с помощью набора QIAprep SPIN Miniprep Kit («QIAGEN», США) и секвенировали по методу Сэнгера в обоих направлениях [10].

Далее плазмиду pPC1-СНІМ1 котрансформировали в ауксотрофный штамм-реципиент *P. canescens* RN3-11-7 вместе с плазмидой pSTA10 (10:1, мкг) по модифицированной методике [11]. Полученные трансформанты культивировали в объеме 100 мл в качалочных колбах Эрленмейера. Для культивирования использовали стандартную ферментационную среду следующего состава (г/л): кукурузный экстракт – 50, соевая шелуха – 45, КН₂Р₄ – 25. Критерием отбора трансформантов служило наличие полосы на электрофореграмме в области 50 кДа. При проведении электрофореза в качестве отрицательного контроля присутствовали культуральные жидкости (КЖ) нетрансформированного штамма *P. canescens* RN3-11-7 и КЖ рекомбинантного штамма – продуцента ЭГП. Электрофорез белков проводили в 12%-м полиакриламидном геле (ПААГ) на приборе «Mini Protean II» («Bio-Rad Laboratories», США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Белковые полосы в гелях окрашивали красителем Кумасси бриллиантовым голубым R-250 («Ferak», Германия). В качестве маркеров использовали смеси белков #26610 (14–116 кДа) производства фирмы «Thermo Scientific» (США).

Выделение и очистка рекомбинантных эндоглюканаз. Выделение гомогенных рекомби-

Таблица 1

Последовательности синтетических олигонуклеотидов, использованных в работе

Название	Последовательность (5' → 3')
EGII-CBD-fwd	TGGAGACTTATTTTGGCTCTAGCACCGGTGGCAG
EGII-CBD-rev	ACCGGTGCTAGAGCCAAAATAAGTCTCCAAAATCG
EGII-UpL	CAAACAGAAGCAACCGACACAATGAAGGCCAGTATCATTCCTG
CBHI-LowL	AGAGCAAGCCGAGCAGGTTACAAGCATTGCGAGTAGTAAG

нантной ЭГП с ЦСМ и рекомбинантной формы ЭГП без ЦСМ осуществляли в три стадии:

обессоливание ферментного препарата (ФП),
анионообменная хроматография (АОХ),
гидрофобная хроматография (ГФХ).

Аналитическое фракционирование проводили с помощью системы высокоэффективной жидкостной хроматографии АКТА Purifier 100 FPLC System («GE Healthcare», Швеция), а также колонки и носители фирм «Pharmacia» и «GE Healthcare» (Швеция). Навеску ФП растворяли в стартовом буфере (20 mM Bis-Tris/HCl; pH 6,8). Для обессоливания использовали систему низкого давления Econo-System («BioRad», США). ФП обессоливали на колонке с акрилексом P2 фирмы «Reanal» (Венгрия) в стартовом буфере. Далее проводили АОХ на колонке с носителем Source 15Q. Образец наносили в соответствующем стартовом буфере; связавшиеся белки элюировали при градиенте концентрации NaCl от 0 до 0,4 М. В полученных при элюировании фракциях определяли авицелазную, КМЦ-азную, β -глюканазную и ксиланазную активность, а также содержание белка. Полученные фракции, обладающие активностью по β -глюкану подвергали ГФХ на колонке с носителем Source 15 ISO («GE Healthcare», США), уравновешенной 0,05 М Na-ацетатным буфером, pH 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 (pH 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 (pH 5,0).

Идентификация эндоглюканаз методом масс-спектрометрии. Идентификацию ЭГП в присутствии и в отсутствие ЦСМ проводили методом пептидного картирования после расщепления белка, содержащегося в соответствующей полосе геля после электрофореза, с помощью трипсина («Promega», США) [12]. МАЛДИ-масс-спектрометрию трипсинового гидролизата белка проводили на времяпролетном масс-спектрометре «UltrafleXtreme» («Bruker Daltonik GmbH», Германия). Полученные данные анализировали путем сравнения массы полученных пептидов и массы теоретических пептидов, рассчитанных с помощью онлайн-сервиса PeptideMass (http://web.expasy.org/peptide_mass/).

Определение активности эндоглюканаз. Значения ферментативной активности определяли по следующим субстратам: β -глюкан

(«Megazyme», Ирландия), натриевая соль КМЦ («Sigma-Aldrich», США), МКЦ (ООО «МКЦ-Центр», Россия). Активность к растворимым полисахаридным субстратам определяли при 50 °С и pH 5,0 по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС). Концентрация полисахаридного субстрата в реакционной смеси составляла 5 г/л. Активность по отношению к МКЦ определяли при 40 °С и pH 5,0 также по начальной скорости образования ВС. Концентрацию ВС определяли методом Шомоди–Нельсона [13].

Активность ферментов выражали в международных единицах (1 единица соответствует образованию 1 мкмоль продукта за 1 мин при действии ферментов на соответствующий субстрат).

Изучение адсорбционной способности эндоглюканаз. Для изучения адсорбционной способности ЭГП на МКЦ в присутствии и в отсутствие ЦСМ готовили суспензию МКЦ (50 г/л) в растворе гомогенного фермента (0,2 г/л). Эксперимент проводили при постоянном перемешивании на магнитной мешалке в течение 30 мин и 8 °С. Далее смесь центрифугировали в течение 3 мин при 14 000 об/мин, затем в супернатанте определяли остаточную концентрацию белка по поглощению при длине волны 280 нм. Результаты выражали в процентном содержании адсорбированного белка по отношению к исходному значению.

Определение кинетических параметров действия эндоглюканаз. Кинетические параметры (K_m , k_{cat}) гидролиза β -глюкана и КМЦ под действием эндоглюканаз определяли по зависимости величины начальной скорости реакции гидролиза (50 °С; pH 5,0) от концентрации субстрата (1–20 г/л) в координатах Лайнуивера–Берка.

Анализ продуктов гидролиза МКЦ. Состав продуктов гидролиза МКЦ определяли методом ВЭЖХ с помощью хроматографа «Agilent 1100 Series» («Agilent Technologies», США) на колонке CarboPac PA-100 («Dionex», США). В качестве детектора использовали электрохимический детектор «Coulchem III ESA» («Dionex», США) с золотым электродом в режиме пульсирующей амперометрии. В качестве стандартов применяли глюкозу, целлобиозу, целлотриозу, целлотетраозу и целлопентаозу («Merck», Германия).

Гидролитическая способность ферментов по отношению к целлюлозосодержащим субстратам. В качестве субстратов для определения гидролитической способности целлюлаз использовали МКЦ и осиновую древесину, измельченную на шаровой мельнице «АГО-2» (Новосибирск, Россия). Реакционная ячейка представляла

собой пластиковую пробирку с закручивающейся крышкой объемом 2 мл (объем реакционной смеси составлял 1,5 мл); для обеспечения перемешивания реакционной смеси в ячейку помещали металлический мешальник. Эксперимент проводили при температуре 50 °С и pH 5,0 (0,1 М Na-ацетатный буфер) при постоянном перемешивании 1000 об./мин, используя термошейкер «BIOSAN TS-100» («BIOSAN», Латвия). Концентрация субстрата составляла 100 г/л (в пересчете на сухое вещество). При проведении гидролиза использовали тройные смеси индивидуальных ферментов (дозировка смеси ферментов составляла 2 мг белка на 1 г субстрата). В состав смеси входили ЭГП-ЦСМ (или ЭГП), ЦБГ1 и БГЛ. Ранее [7] было установлено оптимальное для конверсии целлюлозы соотношение ЦБГ1 и ЭГП, равное 80:20 (по концентрации белка), 10% этой смеси заменяли БГЛ. Гидролиз проводили в течение двух суток. Через 6, 24 и 48 ч из реакционной смеси отбирали пробы, центрифугировали и использовали супернатант для дальнейшего анализа. В пробах методом Шомоди–Нельсона определяли концентрацию ВС [13].

Результаты и их обсуждение

При использовании геномной ДНК *P. verruculosum* в качестве матрицы методом ПЦР были амплифицированы и выделены фрагменты, соответствующие целевому гену *eglIII* и участку

гена *cbhI^{cbd}*, ЦБГ1, кодирующего ЦСМ. Полинуклеотидные последовательности объединили методом ПЦР, а затем клонировали, используя клетки *E. coli* МАСН1, в вектор РС1 для наработки генетического материала с последующим анализом последовательности секвенированием. Плазмиду pPC1-СН1М1 трансформировали в ауксотрофный штамм-реципиент *P. canescens* RN3-11-7, в результате чего был получен набор трансформантов, обладающих признаком прототрофности (т.е. признаком трансформантов, выросших на агаризованных средах с 10 мМ NaNO₃).

Полученные трансформанты культивировали в качалочных колбах, скрининг трансформантов осуществляли по наличию полосы, соответствующей ~50 кДа на Ds-Na-ПААГ-электрофорезе КЖ (рис. 1, А). В качестве контроля использовали штамм-реципиент, не содержащий рекомбинантный фермент. В КЖ, характеризующихся наличием искомой полосы, определяли активность по отношению к КМЦ и β-глюкану относительно КЖ штамма-реципиента. В результате был отобран рекомбинантный штамм В-1, обладающий максимальным значением КМЦ-азной и β-глюканазной активности, который далее культивировали в ферментере объемом 1 л, используя ферментационную среду того же состава, что и при культивировании трансформантов в качалочных колбах. Полученную КЖ сушили на лабораторной распылительной сушилке («ВУСН1-290»,

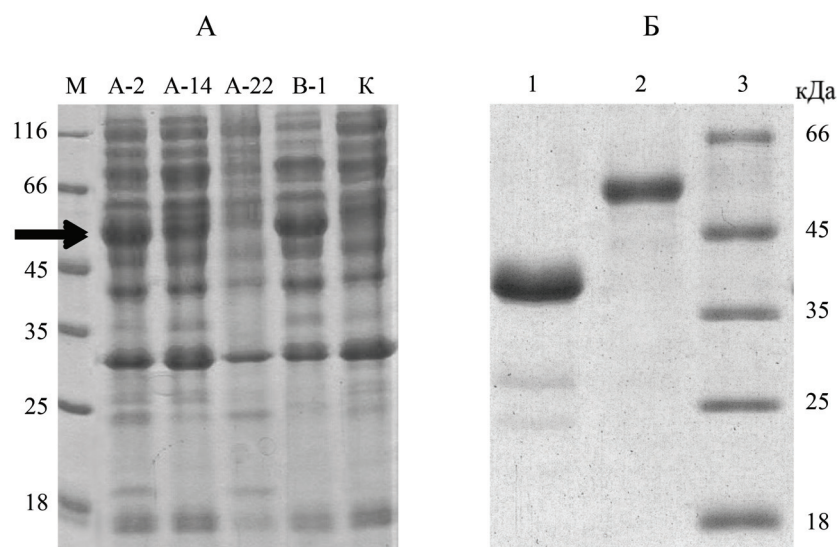


Рис. 1. А – электрофореграмма КЖ рекомбинантных штаммов-продуцентов химерной формы ЭГП-ЦСМ; представлены трансформанты с высокой секрецией целевого белка (отмечен стрелкой) А-2, 14, 22 и В-1; трансформант В-1 отобран для дальнейших исследований; Б – электрофореграмма гомогенных ферментов: 1 – рекомбинантная ЭГП *P. verruculosum*, 2 – химерная форма ЭГП с ЦСМ (выделенная из трансформанта В-1), 3 – стандартные белковые маркеры для Ds-Na-ПААГ

Швейцария), в результате был получен сухой ферментный препарат В-1-2895.

Выделение химерной формы ЭГП из этого ФП осуществляли по методике, описанной в разделе «Материалы и методы». Была получена гомогенная форма ЭГП-ЦСМ с массой 51 кДа. Контролем служила рекомбинантная ЭГП *P. verruculosum* с массой 40 кДа без ЦСМ, выделенная в гомогенном виде по методике, аналогичной использованной для выделения ЭГП-ЦСМ (рис. 1, Б).

Идентификацию ЭГП-ЦСМ проводили методом пептидного картирования путем расщепления трипсином белка, содержащегося в соответствующей полосе геля после Ds-Na-ПААГ-электрофореза, с последующей MALDI-TOF-масс-спектрометрией полученных смесей пептидов. Установлено, что полоса, соответствующая массе 51 кДа, действительно принадлежит химерной форме ЭГП-ЦСМ. Следует отметить, что химерный белок был преобладающим компонентом ФП В-1-2895, его содержание в препарате составило 40% (по белку).

Согласно литературным данным [14], для эндоглюканазы характерна высокая активность по отношению к 1,4-β-глюкозидным связям КМЦ и (1,4-;1,3-)-β-глюкана. Наряду с этим эндоглюканазы способны гидролизовать β-1,3-глюкозидные связи в (1,4-;1,3-)-β-глюкане и 1,3-β-глюкане [15]. Значения удельной активности полученной химерной ЭГП-ЦСМ по отношению к разным субстратам приведены в табл. 2 (активность определена по начальной скорости гидролиза соответствующих субстратов). Сравнение проводили с рекомбинантной ЭГП *P. verruculosum*, не содержащей ЦСМ [16–17]. Химерная ЭГП-ЦСМ обладала меньшей активностью по КМЦ и β-глюкану, чем рекомбинантная ЭГП, однако активность ЭГП-ЦСМ по отношению к МКЦ выросла более чем 20 раз. Таким образом, присоединение ЦСМ

увеличивает активность ЭГП по отношению к нерастворимой целлюлозе, однако снижает этот показатель по отношению к растворимым полисахаридным субстратам.

В табл. 2 представлены данные по адсорбционной способности химерного (ЭГП-ЦСМ) и рекомбинантного (ЭГП) ферментов, определенной на основании остаточной концентрации белка после инкубации раствора ферментов с МКЦ (см. «Материалы и методы»). Установлено, что в условиях эксперимента адсорбция ЭГП-ЦСМ на МКЦ составила 64%, тогда как ЭГП на МКЦ не адсорбировалась вовсе. Вероятно, увеличение удельной активности химерного фермента по отношению к МКЦ объясняется увеличением его сродства к нерастворимому субстрату за счет увеличения адсорбционной способности.

Кинетические параметры (K_m , k_{cat}) были определены по отношению к двум специфическим субстратам – КМЦ и β-глюкану (табл. 3). ЭГП-ЦСМ обладала большим сродством к обоим субстратам, чем ЭГП (значение K_m химерного фермента уменьшилось в 2 раза). При этом каталитическая константа для ЭГП-ЦСМ по отношению к КМЦ уменьшилась по сравнению с ЭГП в 6 раз, а для β-глюкана – в 24 раза. Возможно, это связано со стерическими затруднениями для доступа активного центра химерной формы ЭГП к полисахаридным субстратам из-за наличия ЦСМ. Таким образом, пришивка ЦСМ к каталитическому кору ЭГП обеспечивает некоторое увеличение сродства химерного фермента к растворимым полисахаридным субстратам, однако вызывает затруднения в осуществлении каталитического акта, приводящие к общему уменьшению каталитической эффективности (параметр k_{cat}/K_m , табл. 3). Этим можно объяснить отмеченное выше уменьшение удельной активности химерной формы фермента по отношению

Т а б л и ц а 2

Удельные активности (ед./мг белка) гомогенных эндоглюканаз по отношению к различным субстратам (50 °С, рН 5,0); адсорбционная способность на МКЦ (в % от исходного значения)

Удельная активность по следующим субстратам, ед./мг:	Фермент	
	ЭГП	ЭГП-ЦСМ
КМЦ	40±1	13±0,4
β-Глюкан	28±1	16±0,5
МКЦ	0,003±0,0003	0,06±0,002
Адсорбционная способность, %	0	64±2

Т а б л и ц а 3

Кинетические параметры гидролиза МКЦ и β-глюкана гомогенными эндоглюканазами (50 °С, pH 5,0)

Субстрат	Кинетический параметр	Фермент	
		ЭГП	ЭГП-ЦСМ
МКЦ	K_m , г/л	10,1±0,3	5,8±0,2
	k_{cat} , 1/с	49±2	8,2±0,3
	k_{cat}/K_m , л/(с·г)	4,85±0,15	1,41±0,04
β-Глюкан	K_m , г/л	9,7±0,3	5,8±0,2
	k_{cat} , 1/с	231±7	9,6±0,3
	k_{cat}/K_m , л/(с·г)	23,8±0,7	1,66±0,05

Т а б л и ц а 4

Выход низкомолекулярных сахаров после 48 ч гидролиза МКЦ гомогенными ферментами

Степень полимеризации (Glc_n)	Содержание продуктов, %	
	ЭГП	ЭГП-ЦСМ
Glc_1	1	1
Glc_2	3,4	43
Glc_3	1,5	1
Glc_4	6	52
Glc_5	0,7	1
> Glc_6	>87	<2

к растворимым полисахаридным субстратам по сравнению с ЭГП.

К интересным выводам приводит сравнение продуктов гидролиза МКЦ, полученных с применением ЭГП-ЦСМ и ЭГП. Гидролиз МКЦ проводили в течение 48 ч (40 °С, pH 5) при постоянном перемешивании, концентрация субстрата составила 100 г/л, ферменты дозировали по концентрации белка из расчета 2 мг/г субстрата. Результаты представлены в табл. 4. Основные продукты действия ЭГП-ЦСМ – целлотетраоза (52%) и целлобиоза (43%), при этом содержание олигосахаридов со степенью полимеризации больше 6 не превышало 2%, что отличается от состава продуктов, образующихся под действием ЭГП, основная доля которых (87%) приходилась именно на олигосахариды со степенью полимеризации больше 6. Это свидетельствует об увеличении степени процессивности в действии ЭГП на нерастворимую целлюлозу после пришивки ЦСМ к

каталитическому домену, тогда как ЭГП без ЦСМ осуществляет деструкцию целлюлозы по неупорядоченному механизму.

В завершение была изучена гидролитическая способность ЭГП-ЦСМ по отношению к целлюлозе и целлюлозосодержащим субстратам, в качестве которых были выбраны соответственно МКЦ и измельченная на шаровой планетарной мельнице осиновая древесина (условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы»). За критерий гидролитической способности принимали выход ВС за 24 ч гидролиза. Гидролиз проводили смесями гомогенных ЭГП-ЦСМ (или ЭГП), ЦБГ *P. verruculosum* и БГЛ *A. niger* при их соотношении 18:72:10 (ранее нами было показано, что такое соотношение является оптимальным [7]). Результаты гидролиза МКЦ и измельченной осиновой древесины представлены на рис. 2.

Наличие ЦСМ позволяет химерной форме фермента более эффективно гидролизовать

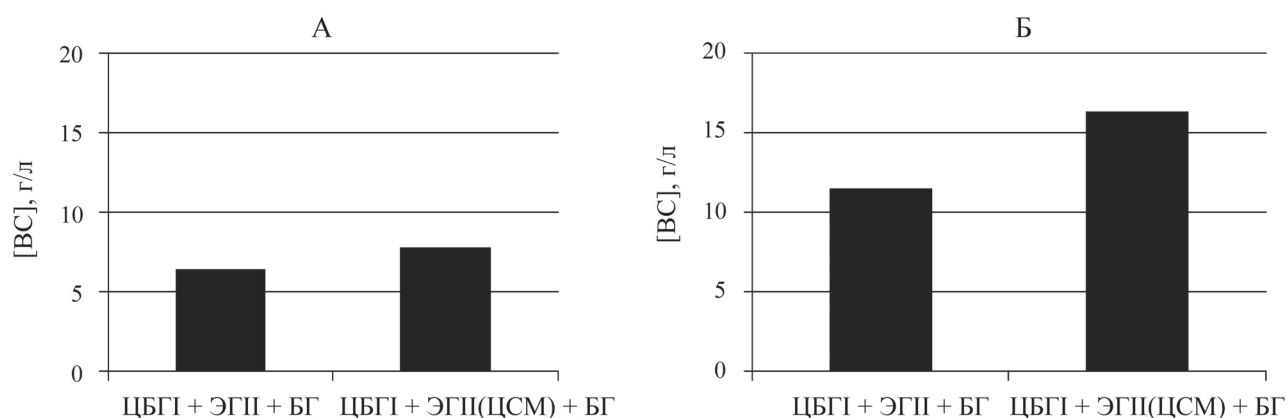


Рис. 2. Выход ВС при гидролизе МКЦ (А) и измельченной осиновой древесины (Б). Условия: 40 °С; pH 5,0; [субстрат] = 100г/л (сухая масса), [Е] = 2 мг белка/г субстрата, перемешивание 250 колебаний/мин

целлюлозосодержащие субстраты и увеличить выход продуктов. Наличие ЦСМ у ЭГП приводит к увеличению выхода продуктов гидролиза как при действии на МКЦ (рис. 2, А), так и на измельченную осиновую древесину (рис. 2, Б). Прирост ВС в случае гидролиза МКЦ комплексом ферментов, в состав которого входила ЭГП-ЦСМ по сравнению с комплексом, содержащим ЭГП, составил 22%, в случае гидролиза измельченной осиновой древесины – 42%.

Таким образом, применение методов генетической инженерии позволило получить химерную

форму ЭГП, к важнейшим приобретенным признаком которой можно отнести увеличение активности к нерастворимой целлюлозе, а также появление способности адсорбироваться на ней. Наличие ЦСМ позволило химерной форме фермента в составе целлюлазного комплекса более эффективно гидролизовать целлюлозосодержащие субстраты и увеличить выход продуктов (сахаров).

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-54-80027).

Конфликта интересов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kumar R., Singh S., Singh O.V. // J. Industr. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 35. N 5. P. 377.
- Merino S.T., Cherry J. // Advan. Biochem. Engin./ Biotechnol. 2007. Vol. 108. P. 95.
- Sims R.E.H., Mabee W., Saddler J.N., Taylor M. // Biores. Technol. 2010. Vol. 101. P. 1570.
- Tseng C.W., Ko T.P., Guo R.T., Huang J.W., Wang H.C., Huang C.H., Xheng Y.S., Wang A., Liu J.R. // Acta Cryst. F. 2011. Vol. 67. N 10. P. 1189.
- Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravilnikov A.G., Osipov D.O., Sinitsyn A.P. // Biotechnol. J. 2010. Vol. 5. P. 871.
- Lee T.M., Farrow M.F., Arnold F.H., Mayo S.L. // Protein Sci. 2011. Vol. 20. N 11. P. 1935.
- Волков П.В., Рожкова А.М., Правильников А.Г., Андрианов Р.М., Доценко Г.С., Беккаревич А.О., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Зоров И.Н., Синецын А.П. // Прикл. биохим. микробиол. 2012. Т. 48. N 1. С. 66.
- Sinitsyn, A. P. and Rozhkova, A. M. // Microbiology Monographs, Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. 2015. P. 1.
- Aslanidis C. and de Jong J.P. // Nucl. Acids Res. 1990. Vol. 18. P. 6069.
- Sanger F., Nicklen S., Chase A.R. // Proc. Nat Acad. Sci. USA. 1977. Vol. 74. P. 5463.
- Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuck A.J. // Current Genetics. 1995. N 28. P. 474.
- James P. Proteome research: mass spectrometry – principles and practice. Heidelberg, 2001.
- Синецын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. // ВИНТИ. М., 1990. Т. 25. С. 30.
- Vlasenko E., Schulein M., Cherry J., Xu F. // Biores. Technol. 2010. Vol. 101. P. 2405.
- Bacic A., Fincher G., Stone B. Chemistry, biochemistry and biology of (1–3)- β -glucans and related polysaccharides. N.Y., 2019.
- Dotsenko A.S., Gusakov A.V., Volkov P.V., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. // Biotechnol. Bioeng. 2016. Vol. 113. P. 283.
- Мерзлов Д.А., Зоров И.Н., Доценко Г.С., Денисенко Ю.А., Рожкова А.М., Сатрутдинов А.Д., Рубцова Е.А., Кондратьева Е.Г., Синецын А.П. // Биохимия. 2015. Т. 80. Вып. 4. С. 556.

Поступила в редакцию 25.03.2019
Получена после доработки 29.03.2019
Принята к публикации 01.04.2019

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE PROPERTIES OF RECOMBINANT ENDO-1,4- β -GLUCANASE II AND ITS CHIMERIC FORM WITH A CELLULAR BINDING MODULE

O.G. Korotkova^{1*}, M.V. Semenova¹, E.A. Rubtsova¹, O.A. Sinitsyna², E.G. Kondrat'eva¹, N.M. Bibikov³, A.M. Rozhkova^{1*}, A.P. Sinitsyn^{1,2}

(¹Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences; ²Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University; ³Faculty of biological, M.V. Lomonosov Moscow State University; *e-mail: amrojkova@mail.ru)

A chimeric form of *Penicillium verruculosum* endo-1,4- β -glucanase II (EGII), to the C-terminus of which contains a cellulose-binding module (CBM) of *P. verruculosum* cellobiohydrolase I, has produced by genetic engineering method. In native form the *egII* gene does not have a region encoding CBM. The resulting chimeric enzyme was isolated in a homogeneous form and its properties has been studied. The addition of CBM to EGII led to significant increase in the activity of the chimeric enzyme to microcrystalline cellulose (MCC), as well as its adsorption capacity for cellulose has been observed. However, the addition of CBM to EGII led to a decrease in activity towards soluble polysaccharide substrates (carboxymethylcellulose and β -glucan). The chimeric form of the enzyme in the composition of the cellulase complex allowed to hydrolyze cellulose-containing substrates more effectively. The increase in reducing sugars (RS) in the case of MCC hydrolysis was 22% after 24 hours with a cellulose complex containing cellobiohydrolase I, β -glucosidase and EGII-CBM in comparison to the complex containing EGII without CBM.

Key words: endo-1,4-b-endoglucanase, complex of cellulases, cellulose-binding module, hydrolysis, *Penicillium verruculosum*.

Сведения об авторах: Короткова Ольга Генриховна – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (littletempo@yandex.ru); Семенова Маргарита Викторовна – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (margs@mail.ru); Рубцова Екатерина Александровна – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (katefedo@yandex.ru); Синицына Ольга Аркадьевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (oasinityna@gmail.com); Кондратьева Елена Геннадьевна – ст. науч. сотр. лаборатории химической энзимологии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. физ.-матем. наук (elgenkon@inbox.ru); Бибииков Никита Михайлович – студент магистратуры биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (bibik0808@mail.ru); Рожкова Александра Михайловна – ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (amrojkova@yahoo.com); Синицын Аркадий Пантелеймонович – зав. лаб. на кафедре химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова и зав. лаб. биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, докт. хим. наук, профессор (apsinityn@gmail.com).