

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова
Химический факультет

Кафедра химической энзимологии
Лаборатория физико-химии ферментативной трансформации полимеров

Марочкина Мария Александровна

**Свойства комплексных ферментных препаратов фитазы,
эндоглюканазы и ксиланазы**

Дипломная работа

Научный руководитель:
к.х.н, с.н.с. Сеницына О. А.

Оглавление

Список сокращений.....	5
Введение.....	7
I. Обзор литературы.....	9
1.1 Ксиланазы.....	9
1.1.1 Ксиланы.....	9
1.1.2 Эндо-1,4-ксиланазы.....	11
1.2 Эндоглиюканазы.....	22
1.2.1 Целлюлоза.....	22
1.2.2 Нецеллюлозные β -глюканы.....	23
1.2.3 Эндоглиюканазы.....	26
1.3 Фитазы.....	32
1.3.1 Фитаты.....	32
1.3.2 Фитазы.....	33
1.4 Применение ксиланаз, эндоглиюканаз и фитаз в современных биотехнологических процессах.....	39
1.5 Характеристика грибного штамма <i>Penicillium verruculosum</i> как продуцента рекомбинантных ферментов.....	41
1.6 Улучшение свойств карбогидраз методами белковой инженерии.....	43
II. Экспериментальная часть.....	46
2.1 Материалы.....	46
2.1.1 Ферментные препараты.....	46
2.1.2 Субстраты.....	46
2.1.3 Прочие реактивы.....	47
2.1.4 Хроматографические сорбенты.....	47
2.2 Методы.....	48
2.2.1 Определение концентрации белка.....	48
2.2.2 ДДС-ЭФ и содержание целевых белков в ФП.....	48

2.2.3 Выделение и очистка ферментов	48
2.2.4 Определение активностей	49
2.2.5 Определение рН- и температурных оптимумов действия ферментов	50
2.2.6 Изучение влияния температуры на активность ферментов в растворе	51
2.2.7 Изучение стабильности сухих ФП и гомогенных ферментов при высокой температуре.....	51
III. Результаты и их обсуждение	52
3.1 Активность новых ФП.....	52
3.2 Компонентный состав новых ФП.....	55
3.3 Свойства новых комплексных ФП, обогащённых XylEстаб, Eg2стаб и PhyAстаб	56
3.3.1 Влияние рН и температуры на активность ФП, содержащих XylEстаб, Eg2стаб и PhyAстаб	56
3.3.2 Стабильность ФП, содержащих XylEстаб, Eg2стаб и PhyAстаб, в растворе при длительном воздействии повышенных температур	60
3.3.3 Стабильность ФП, содержащих XylEстаб, Eg2стаб и PhyAстаб, в растворе при кратковременном воздействии высоких температур.....	60
3.3.4 Стабильность ФП, содержащих XylEстаб, Eg2стаб и PhyAстаб, в сухом виде при кратковременном воздействии высоких температур.....	63
3.4 Сравнительное исследование XylE и XylEстаб	65
3.4.1 Выделение и очистка XylE и XylEстаб	65
3.4.2 Влияние рН и температуры на активность XylE и XylEстаб.....	68
3.4.3 Стабильность XylE и XylEстаб в растворе при длительном воздействии повышенных температур.....	70
3.4.5 Стабильность XylE и XylE стаб в растворе при кратковременном воздействии высоких температур	71
3.4.6 Стабильность XylE и XylE стаб в сухом виде при кратковременном воздействии высоких температур	73
3.5 Сравнительное исследование Eg2 и Eg2стаб	74
3.5.1 Выделение и очистка Eg2 и Eg2стаб	74
3.5.2 Влияние рН и температуры на активность Eg2 и Eg2стаб.....	77

3.5.3 Стабильность Eg2 и Eg2стаб в растворе при длительном воздействии повышенных температур.....	79
3.5.4 Стабильность Eg2 и Eg2стаб в растворе при кратковременном воздействии высоких температур.....	81
3.5.5 Стабильность Eg2 и Eg2стаб в сухом виде при кратковременном воздействии высоких температур.....	82
3.6 Сравнительное исследование PhyA и PhyАстаб.....	84
3.6.1 Выделение и очистка PhyA и PhyАстаб.....	84
3.6.2 Влияние рН и температуры на активность PhyA и PhyАстаб	87
3.6.3 Стабильность PhyA и PhyАстаб в растворе при длительном воздействии повышенных температур.....	89
3.6.4 Стабильность PhyA и PhyАстаб в растворе при кратковременном воздействии высоких температур.....	90
3.6.5 Стабильность PhyA и PhyАстаб в сухом виде при кратковременном воздействии высоких температур.....	92
Выводы	94
Список источников.....	96

Список сокращений

БСА - бычий сывороточный альбумин

ВС - восстанавливающие сахара

ДДС-ЭФ - электрофорез в денатурирующих условиях

ДДС-На - додецилсульфат натрия

ГПХ - гель-проникающая хроматография

КМЦ - карбоксиметилцеллюлоза

НПС – некрахмальные полисахариды

ОФ - объединённые фракции

ПААГ - полиакриламидный гель

ФП – ферментный препарат

ЦБГ – целлобиогидролаза

Aspergillus – A.

Aerobacter – Aer.

Bacillus – B.

Bradyrhizobium – Br.

Cellvibrio – C.

Erwinia – E.

Myceliophthora – M.

Paenibacillus – Paen.

Penicillium – P.

Pseudoalteromonas – Ps.

Trichoderma – T.

Thermobifida – Th.

Saccharomyces – Sac.

Streptococcus – Str.

Streptomyces – S.

Xanthomonas – X.

Введение

Основными компонентами кормов в животноводстве и птицеводстве являются злаковые культуры (пшеница, рожь, овес, ячмень). Помимо крахмала и белков (питательных веществ) зерна злаковых содержат антипитательные факторы — фитаты и некрахмальные полисахариды (НПС), такие как целлюлоза, β -глюканы, ксиланы. Фитаты являются основной запасной формой фосфора в семенах растений, однако фитатный фосфор не доступен животным для усвоения. Кроме того, он связывает важные питательные вещества (аминокислоты, макро- и микроэлементы) и снижает их усвояемость. НПС не перевариваются в желудочно-кишечном тракте птиц и моногастричных животных, набухают в кишечнике, из-за чего повышается вязкость химуса и затрудняется доступ пищеварительных ферментов к питательным веществам кормов, что вызывает их неполное усвоение и ряд других негативных последствий. Использование в качестве добавок ферментных препаратов (ФП), содержащих ферменты, гидролизующие фитаты и НПС, позволяет повысить усвояемость корма, а также снизить нагрузку фосфора на окружающую среду, связанную с потреблением сельскохозяйственными животными минеральных фосфатов.

На сегодняшний день на российском заводе АгроФермент уже производятся ФП с повышенным содержанием одного из компонентов комплекса - фитазы, ксиланазы или эндоглюканызы: это препараты Агрофит, Агроксил и Агроцелл. Данные препараты получают в результате ферментаций, проводимых с использованием новых штаммов, созданных нашими коллегами из Института биохимии имени А.Н. Баха РАН (ИНБИ РАН) на базе высокопродуктивного реципиентного грибного штамма *Penicillium verruculosum* B1-537 (Δ niaD). Эти штаммы несут гомологичный ген эндо- β -1,4-глюканызы 2 (Eg2), характеризующейся высокой активностью по отношению к целлюлозе и β -глюкану, а также гетерологичные гены неингибируемой эндо- β -1,4-ксилианазы E (XylE) *P. canescens* - активной по отношению к ксиланам, или фитазы *Aspergillus niger* (PhyA), характеризующейся высокой активностью по отношению к фитатам.

Однако стоит отметить, что для повышения кормовой эффективности целесообразно использовать не монокомпонентные, а комплексные ферментные препараты с одновременным повышенным содержанием двух и более ферментов, гидролизующих НПС. Нашими коллегами из лаборатории Биотехнологии ферментов ИНБИ РАН была проведена трансформация реципиентного штамма *P. verruculosum* B1-537(Δ niaD) плазмидами, несущими гены Eg2, XylE и PhyA в различных комбинациях. В результате на

основе новых штаммов-продуцентов были получены ферментные препараты (ФП), обогащённые несколькими из вышеперечисленных ферментов в различных сочетаниях: это «дуплеты» PhyA + Eg2, PhyA + XylE, Eg2 + XylE и «триплет» PhyA + Eg2 + XylE. Кроме того, на основе того же реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-537(Δ niaD) нашими коллегами были созданы продуценты стабилизированных (путём направленного мутагенеза) форм эндоглюканазы, ксиланазы и фитазы и на их основе получены ФП, обогащённые Eg2стаб, XylEстаб и PhyAстаб.

Целью данной работы являлось изучение состава и свойств комплексных ФП фитазы, эндоглюканазы и ксиланазы.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

- исследовать активности новых комплексных ФП, обогащенных XylE, Eg2 и PhyA, а также Eg2стаб, XylEстаб и PhyAстаб по отношению к различным углеводсодержащим субстратам;
- изучить компонентный состав новых комплексных ФП, обогащенных XylE, Eg2 и PhyA, а также Eg2стаб, XylEстаб и PhyAстаб, методами ДДС-электрофореза (ДДС-ЭФ) и белковой хроматографии;
- изучить свойства комплексных ФП, обогащенных Eg2стаб, XylEстаб и PhyAстаб и сопоставить со свойствами ФП, обогащённых «нативными» ферментами;
- выделить в гомогенном виде Eg2стаб, XylEстаб и PhyAстаб и провести исследование их свойств в сравнении со свойствами «нативных» ферментов (активность по отношению к специфическим субстратам, рН и Т-профиль активности, стабильность в растворах и в сухом виде при различных значениях температуры).

I. Обзор литературы

1.1 Ксиланазы

1.1.1 Ксиланы

Клетки растений окружены жесткой стенкой, обеспечивающей их структуру и защиту. Клеточная стенка состоит из целлюлозы, микрофибриллы, пектина, гемицеллюлозы и лигнина. Основой гемицеллюлоз злаков и двудольных растений является ксилан. Он повышает сопротивляемость клеточных стенок и тем самым помогает защищаться от травоядных и патогенов [1].

Ксиланы представляют собой полисахариды, не имеющие повторяющейся структуры. Общим признаком ксиланов является скелет из β -(1 \rightarrow 4)-связанных остатков ксилозы (рисунок 1 [1], рисунок 2 [2]).

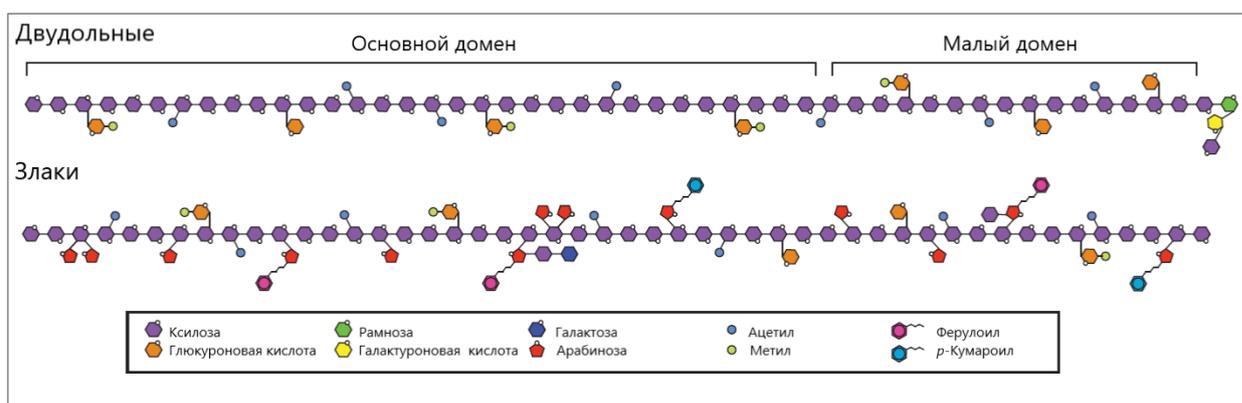


Рисунок 1. Обобщённые структуры ксилана [2].

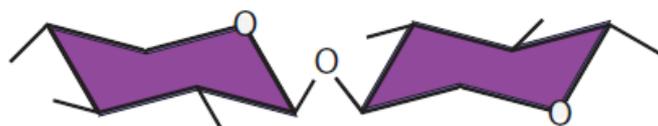


Рисунок 2. Остов β -(1 \rightarrow 4)-ксилана [2].

Строение ксиланов различается не только в зависимости от вида растения, из которого их выделяют, но и в зависимости от ткани растения. Распространенной модификацией является α -(1 \rightarrow 2)-связанные глюкуронозилные и 4-О-метилглюкуронозилные остатки в качестве боковых заместителей. Ксиланы, в которых преобладает этот тип замещения,

известны как глюкуроноксиланы (рисунок 3) и являются доминирующим нецеллюлозным полисахаридом во вторичных стенках двудольных растений. У злаков ксиланы являются основным нецеллюлозным полисахаридом первичных стенок, составляя около 20% полисахаридов стенки. Эти ксиланы обычно содержат много остатков арабинозы, прикрепленных к основной цепи, и известны как арабиноксиланы и глюкуроноарабиноксиланы (рисунок 4) [2].

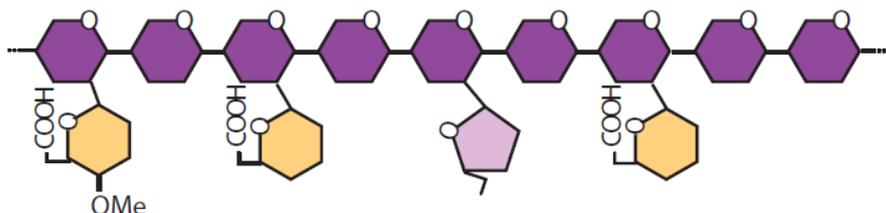


Рисунок 3. Схематичное изображение глюкуроноксилана [2].

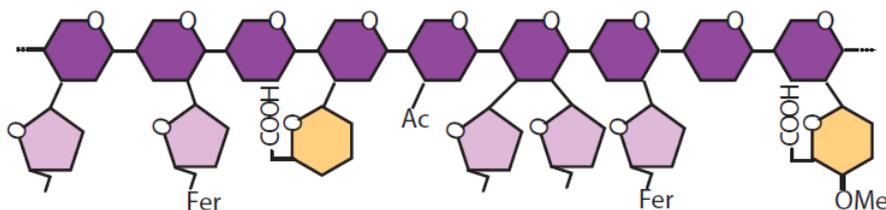


Рисунок 4. Схематичное изображение глюкуроноарабиноксилана [2].

В ксиланах стенок злаков замещение арабинофуранозой в основном происходит по O-3 остаткам ксилозы основной цепи. В эндосперме злаков распространены остатки ксилозы, дважды замещенные арабинофуранозой как в O-2, так и в O-3 положении [3]. У ксиланов двудольных арабинофуранозильные остатки обычно находятся в положении O-2, а не O-3, как у злаков [4], но описаны и дважды замещенные остатки ксилозы.

Ещё одной особенностью ксиланов злаков является наличие в составе эфиров кумаровой и феруловой кислот.

В структуре практически всех ксиланов встречаются - в качестве боковых заместителей - ацетильные группы в O-3 положении ксилозного кольца, особенно много их во вторичных стенках двудольных растений.

На восстанавливающих концах молекул ксилана двудольных находится олигосахарид 4-β-D-Xyl-(1-4)-β-D-Xyl-(1-3)-α-L-Rha-(1-2)-α-D-GalA-(1-4)-D-Xyl (рисунок 5). Функция

этого олигосахарид неизвестна, хотя предполагается, что он служит либо инициатором, либо терминатором синтеза основной цепи ксилана [5].

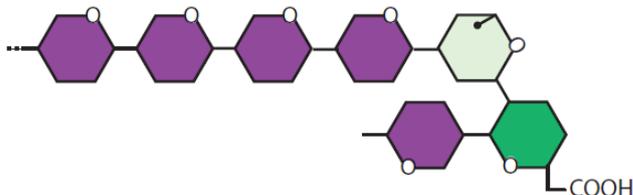


Рисунок 5. Схематическое изображение олигосахарид 4-β-D-Xyl-(1-4)-β-D-Xyl-(1-3)-α-L-Rha-(1-2)-α-D-GalA-(1-4)-D-Xyl, расположенного на восстанавливающем конце ксилана [2].

Остаётся открытым вопрос взаимодействия ксилана с другими полимерами клеточной стенки. Предполагается, что ксилан покрывает микрофибриллы целлюлозы и сшивает их друг с другом или с другими полимерами посредством водородных связей [6]. Ксилан также может ковалентно связываться с другими полимерами клеточной стенки. Он может быть связан с лигнином посредством сложноэфирных связей с глюкуронозилем и эфирных связей с остатками ксилозы или арабинозы [7], а сложные эфиры феруловой кислоты в ксиланах злаков могут подвергаться окислительной димеризации с образованием поперечных связей с соседними ксилановыми цепями или лигнином.

Ферментативная деградация ксиланов в природе происходит под действием системы гемицеллюлозолитических ферментов, ключевыми из которых являются ксиланазы (эндо-1,4-ксиланазы, КФ 3.2.1.8).

1.1.2 Эндо-1,4-ксиланазы

Эндо-1,4-ксиланазы (КФ 3.2.1.8) представляют собой гликозидазы, которые катализируют гидролиз 1,4-β-D-ксилозидных связей в ксилане по эндо-деполимеразному механизму.

Продуценты ксиланаз

Ксиланазы продуцируются различными организмами: простейшими, бактериями, грибами, водорослями, растениями, насекомыми, брюхоногими моллюсками, червями, и т.д. Наиболее хорошо изучены ксиланазы микробного происхождения, выделенные из бактерий и микроскопических грибов. Типичные примеры таких продуцентов включают бактерии *Cellulomonas fimi*, *Cellvibrio japonicus*, *C. mixtus*, *Streptomyces lividans*, *Thermotoga maritima*, *Bacillus subtilis*, а также грибы *Trichoderma reesei*, *P. funiculosum*, *P.*

canescens и др. Многие из них продуцируют несколько ксиланаз [8], [9], [10]. Например, *A. niger* продуцирует пятнадцать внеклеточных ксиланаз, а *T. viride* тринадцать [11]. Они могут иметь различные физико-химические свойства, структуру, специфические активности, а также перекрывающиеся, но разные специфичности, что повышает эффективность и степень гидролиза, а также разнообразие и сложность ферментов.

Классификация ксиланаз

Большинство известных микробных ксиланаз относятся к 10 и 11 семействам гликозидгидролаз (GH10 и GH11), однако известны ксиланазы, относящиеся к 5, 7, 8 и 43 семействам (<http://www.cazy.org/>).

Члены семейств 5, 7, 8, 10, 11 и 43 различаются по своим физико-химическим свойствам, структуре, механизму действия и субстратной специфичности. Однако между ними есть сходства, что позволяет объединять семейства в кланы по определённым признакам. Например, сходство трёхмерной структуры представителей семейств 5 и 10 позволяет отнести их к клану GH-A.

Механизмы действия ферментов также являются общими для представителей определённых семейств. Эта и другие характеристики (трёхмерная структура, механизм действия и каталитические остатки, характерные для каждого семейства ксиланаз, относящихся к различным семействам) представлены в таблице 1 [12].

На рисунке 6 представлены репрезентативные структуры ферментов, относящихся к различным семействам гликозид-гидролаз. Показана структура бочонка $(\beta/\alpha)_8$ каталитического домена и β_9 -бочонок малого домена ксиланазы XynA из *Erwinia chrysanthemi*, принадлежащей к семейству 5 [13]. В двух перпендикулярных проекциях представлена структура $(\alpha/\alpha)_6$ каталитического домена ксиланазы семейства 8, pXyl, из *Pseudoalteromonas haloplanktis* ТАН3а [14]. Показаны структуры ксиланазы *S. lividans*, характерной для 10 семейства [15], ксиланазы *T. reesei* семейства 11 [16], структура неспецифического EGI семейства 7 *T. reesei* [17] и структура α -L-арабинаназы *C. japonicus* семейства 43 [18].

Таблица 1. Семейства гликозидгидролаз, содержащие ферменты с продемонстрированной активностью по отношению к ксилану [12].

Семейство гликозидгидролаз	Ферменты с продемонстрированной ксиланазной активностью	Тип структуры	Клан	Механизм катализа	Общий кислотно-основный остаток	Нуклеофил/общее основание
5	8	(β/α) ₈	GH-A	Сохранение аномерной конфигурации	Глутамат	Глутамат
7	1	β -железный рулет	GH-B	Сохранение аномерной конфигурации	Глутамат	Глутамат
8	4	(α/α) ₆	GH-M	Обращение аномерной конфигурации	Глутамат*	Аспаргат*
10	127	(β/α) ₈	GH-A	Сохранение аномерной конфигурации	Глутамат	Глутамат
11	173	β -железный рулет	GH-C	Сохранение аномерной конфигурации	Глутамат	Глутамат
43	1	Пятилопастной β -пропеллер	GH-F	Обращение аномерной конфигурации	Глутамат*	Аспаргат*

* – предполагаемые остатки

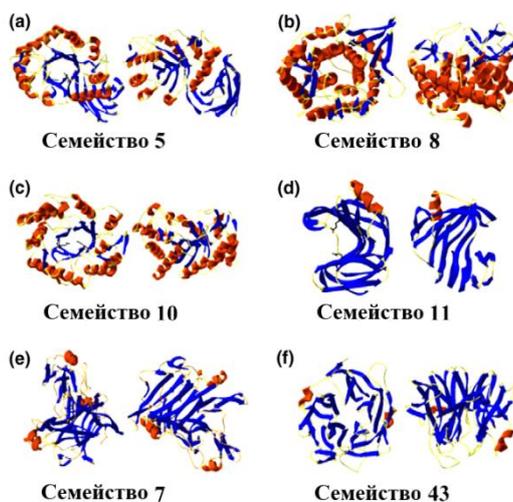


Рисунок 6. Репрезентативные структуры ферментов из различных семейств гликозидгидролаз [12].

Ксиланазы семейства 5

На сегодняшний день в 5 семействе было зарегистрировано восемь ферментов с продемонстрированной активностью по отношению к ксилану. Ряд других предполагаемых ксиланаз, идентифицированных по сходству последовательностей в ходе программ секвенирования генома, были идентифицированы в *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (2 предполагаемые ксиланазы) [19], *Leptosphaeria maculans* (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/>), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 (2 предполагаемые ксиланазы) [20], *X. campestris* pv. *campestris* str. ATCC 33913 [20], *B. subtilis* str. 168 [21] и *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 [22]. Ксиланазная активность также была явно продемонстрирована для ферментов из *Aeromonas punctata* (*caviae*) W-61, *Erwinia* (*Pectobacterium*) *chrysanthemi* P860219, *Meloidogyne incognita* и *Ruminococcus albus* 7 (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/>). Всего известно 20 предполагаемых ксиланолитических позиций, однако лишь 4 из них имеет высокое сходство аминокислотных последовательностей с представителями 5 семейства. Остальные 16 имеют гомологию с ферментами семейства 30 или представителями, не относящимися к семействам гликозид-гидролаз. Также было обнаружено, что ксиланазы этого семейства обладают разной субстратной специфичностью. Например, ферменты из *Prevotella ruminicola* 23 [23], *Clostridium cellulovorans* [24], *F. succinogenes* S85 [25] и *R. albus* SY3 [26] обладают как ксиланазной, так и карбоксиметилцеллюлазной активностью, в то время как ферменты из *T. reesei* [27], *Erwinia chrysanthemi* D1 и *E. chrysanthemi* SR120A [28] активны только по ксилану. Было обнаружено, что из четырех ферментов семейства 5, проявляющих карбоксиметилцеллюлазную и ксиланазную активности, ксиланаза *P. ruminicola* 23 обладает наибольшей активностью в отношении к ксилану, при этом активность по карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ) составляет всего 18% от суммарной [23].

Из ксиланаз 5 семейства была определена структура только Хуп А из *E. chrysanthemi* (разрешение 1,42 Å) [13]. Хуп А состоит из двух доменов, более крупный домен содержит каталитический сайт и имеет структуру бочонка $(\beta/\alpha)_8$, в то время как малый домен, вероятно, функционирует как ксилан-связывающий и имеет структуру бочонка β_9 . Домены соединены двумя линкерными пептидами, а также 11 водородными связями и гидрофобными взаимодействиями [13]. β -Стол каталитического домена Хуп А имеет эллиптическую форму, активный центр образован кислотной щелью, расположенной на С-концевой стороне β -цепей вблизи большей поверхности молекулы.

Ксиланазы семейства 8

На сегодняшний день семейство 8 включает в себя четыре ксиланазы, выделенные из *B. halodurans* C-125, *B. halodurans* MIR32, *B. sp. KK-1* и *Ps. haloplanktis* ТАН3а. Ксиланазы, выделенные из *B. halodurans* C-125 и *B. halodurans* MIR32, имеют идентичные аминокислотные последовательности, однако о свойствах этих ферментов известно мало. Более детально были изучены ксиланаза из *Bacillus sp. KK-1* и адаптированная к холоду ксиланаза *Ps. haloplanktis* ТАН3а. Ферменты имеют молекулярную массу 46 и 45 кДа соответственно, рН-оптимумы их активности совпадают (6,5).

Предполагается, что все ксиланазы семейства 8 имеют одинаковую трёхмерную структуру, однако она была изучена только для ксиланазы из *Ps. haloplanktis* ТАН3а. Этот фермент сворачивается в искаженный $(\alpha/\alpha)_6$ бочонок, образованный шестью внутренними и шестью внешними α -спиралями. В отличие от обычных $(\alpha/\alpha)_6$ -бочковых белков, этот фермент имеет дополнительную α -спираль вблизи N-конца. Глобулярное ядро имеет искажённую сферическую форму с длинной кислотной щелью, проходящей по молекулярной поверхности на N-конце внутренних спиралей, в то время как предполагаемые каталитические остатки (глутамат, выступающий в качестве донора протона, и аспаратат - в качестве акцептора) расположены близко друг к другу около середины щели.

Обе ксиланазы активны только по отношению к ксилану, а адаптированная к холоду ксиланаза гидролизует ксилан в основном до ксилотриозы и ксилотетраозы и наиболее активна в отношении длинноцепочечных ксилоолигосахаридов. Предполагается, что эти ферменты гидролизуют субстрат с инверсией аномерной конфигурации [12].

Ксиланазы семейства 10

Это семейство включает эндо-1,3- β -ксиланазы (КФ 3.2.1.32) и эндо-1,4- β -ксиланазы (КФ 3.2.1.8), которые являются преобладающими. В таблице 2 представлены ксиланазы 10 семейства, структуры которых были изучены, а также их организмы-продуценты.

Представители этого семейства имеют высокую молекулярную массу и низкий рI.

Ферменты 10 семейства обычно имеют структуру бочонка $(\alpha/\beta)_8$, где одна сторона молекулы имеет большой радиус (приблизительно 45 Å) из-за сложной архитектуры петель, а противоположная сторона, состоящая из простых поворотов α/β , имеет радиус примерно 30 Å [12].

Исследования субстратной специфичности показали, что эндо-1,4-β-ксилазы 10 семейства могут проявлять активность по отношению к низкомолекулярным целлюлозным субстратам [29], в частности к арилцеллобиозидам [30] и некоторым целлоолигосахаридам [31]. Члены этого семейства также способны гидролизовать арил-β-гликозиды ксилобиозы и ксилотриозы по агликоновой связи [30].

Эндо-1,4-β-ксилазы 10 семейства имеют 4–5 небольших сайтов связывания с субстратом, на что указывает высокая активность по отношению к коротким ксилоолигосахаридам, а также анализ кристаллических структур и конечных продуктов гидролиза. Исследования гидролиза также показали, что большинство ксиланаз 10 семейства могут атаковать ксилозидную связь на невозстанавливаемом конце замещенного остатка или 1,3-β-связь, но могут расщеплять только третью ксилозидную связь после замещенного остатка и вторую после 1,3-β-связи. Это указывает на то, что субсайты на невозстанавливаемом конце более специфичны, чем субсайты на восстанавливаемом конце сайта расщепления [30].

Таблица 2. Ксиланазы 10 семейства [12].

Фермент	Источник	Код(ы) в базе данных PDB
Ксиланаза (Хун 10А)	<i>Cellulomonas fimi</i>	1EXP, 1FH7, 1FH8, 1FH9, 1FHD, 1J01, 2EXO, 2HIS, 2XYL
Ксиланаза А (Хун 10А)	<i>Cellvibrio japonicus</i>	1CLX, 1E5N, 1XYS
Ксиланаза F (Хун 10С)	<i>Cellvibrio japonicus</i>	1US2, 1US3
Ксиланаза С (Хун 10В)	<i>Cellvibrio mixtus</i>	1UQY, 1UQZ, 1UR1, 1UR2
Ксиланаза Z	<i>Clostridium thermocellum</i> NCIB 10682	1XYZ
Ксиланаза Т-6	<i>Geobacillus stearothermophilus T-6</i>	1HIZ, 1R85, 1R86, 1R87
Ксиланаза (Хун А2)	<i>Geobacillus stearothermophilus T-6</i>	1N82
Ксиланаза А (Хун А)	<i>Penicillium simplicissimum BT2246</i>	1B30, 1B31, 1B3V, 1B3W, 1B3X, 1B3Y, 1B3Z, 1BG4
Ксиланаза 1	<i>Streptomyces halstedii JM8</i>	1NQ6
Ксиланаза А	<i>Streptomyces lividans</i>	1E0V, 1E0W, 1E0X, 1XAS, 1OD8
β-1,4- Ксиланаза	<i>Streptomyces olivaceoviridis E-86</i>	1ISV, 1ISW, 1ISX, 1ISY, 1ISZ, 1ITO, 1XYF
Ксиланаза	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	1FXM, 1GOK, 1GOM, 1GOO, 1GOQ, 1GOR, 1I1W, 1I1X, 1K6A, 1TAX, 1TIX, 1TUX
Ксиланаза В	<i>Thermotoga maritima</i>	1VBR, 1VBU

Ксиланазы семейства 11

В отличие от всех обсуждавшихся ранее семейств, это семейство состоит исключительно из ксиланаз. Более того, эти ксиланазы обладают более высокой субстратной специфичностью, чем ксиланазы семейства 10. Они активны исключительно по отношению к субстратам, содержащим D-ксилозу и предпочтительнее гидролизуют длинноцепочечные ксилоолигосахариды. Подобно ксиланазам семейства 10, представители семейства 11 могут гидролизовать арил- β -гликозиды ксилобиозы и ксилотриозы по агликоновой связи, но в отличие от этого семейства они неактивны в отношении арилцеллобиозидов. Кроме того, они не способны расщеплять β -1,3-связи, что приводит к образованию более крупных продуктов, которые могут быть дополнительно гидролизованы ксиланазами семейства 10 [30].

Ферменты семейства 11, как правило, характеризуются высоким pI и низкой молекулярной массой. В активном центре ферментов находятся два остатка глутаминовой кислоты, выполняющие каталитическую функцию, гидролиз осуществляется по механизму двойного замещения.

По сравнению с представителями 10 семейства ксиланазы семейства 11 имеют более крупные щели в структуре молекулы, в которых происходит связывание субстрата. При этом сайтов связывания у представителей семейства 11 больше, например, ксиланазы из *Schizophyllum commune* и *A. niger* имеют как минимум семь субсайтов [32].

Для представителей семейства 11 характерна структура β -желейного рулета: β -складчатые листы упакованы в два или три слоя гидрофобными поверхностями друг к другу и образуют двухслойный жёлоб, который окружает каталитический центр. β -слои образуют гидрофобное ядро белка, в котором присутствует одна α -спираль, прилегающая к гидрофобной поверхности второго β -листа.

Ещё одним различием между ксиланазами семейств 10 и 11 является стереохимия их протонирования и влияние X-эпоксиалкилгликозидов ксилозы и ксилоолигосахаридов на активность ферментов. В случае ксиланаз семейства 10 протонирование происходит по анти-механизму, при этом они не подвержены влиянию X-эпоксиалкилгликозидов. Для ксиланаз семейства 11 характерно син-протонирование, и они инактивируются X-эпоксиалкилгликозидами [33].

В таблице 3 приведены ксиланазы 11 семейства, структуры которых были изучены [12].

Таблица 3. Ксиланазы 11 семейства [12].

Фермент	Источник	Код(ы) в базе данных PDB
Ксиланаза С	<i>Aspergillus kawachii</i>	1BK1
Ксиланаза 1	<i>Aspergillus niger</i>	1UKR
Ксиланаза	<i>Bacillus agaradhaerens AC13</i>	1H4G, 1H4H, 1QH6, 1QH7
Ксиланаза А	<i>Bacillus circulans</i>	1BCX, 1BVV, 1C5H, 1C5I, 1HV0, 1HV1, 1XNB, 1XNC, 2BVV
Ксиланаза	<i>Bacillus subtilis B230</i>	1IGO
Ксиланаза А	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168</i>	1AXK
Ксиланаза 11А	<i>Chaetomium thermophilum</i>	1H1A
Ксиланаза (Хун В)	<i>Dictyoglomus thermophilum Rt46B.1</i>	1F5J
Ксиланаза 11А	<i>Nonomuraea flexuosa</i>	1M4W
Ксиланаза	<i>Paecilomyces varioti Bainier</i>	1PVX
Ксиланаза	<i>Streptomyces sp. S38</i>	1HIX
Ксиланаза	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	1YNA
Ксиланаза	<i>Trichoderma harzianum E58 (Hypocrea lixii E58)</i>	1XND
Ксиланаза 1	<i>Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina)</i>	1XYN
Ксиланаза 2	<i>Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina)</i>	1ENX, 1RED, 1REE, 1REF, 1XYO, 1XYP

Ксиланазы семейств 7 и 43

На сегодняшний день в каждом из семейств 7 и 43 идентифицирован и изучен только один фермент, проявляющий ксиланазную активность. Важно отметить, что ни один из них не является истинной ксиланазой: фермент семейства 7, EGI (Cel7B) из *T. reesei*, представляет собой неспецифическую эндо- β -1,4-глюканазу (КФ 3.2.1.4) [17], а фермент семейства 43 ХунD из *Paenibacillus polymyxa* проявляет ксиланазную и α -L-арабинофуранозидазную активности [34].

Эндоглюканаза I семейства 7 (EGI) из *T. reesei* не продуцируется при росте на ксилане и обладает в 10 раз большей активностью по отношению к целлюло-олигосахаридам, чем по отношению к ксилоолигосахаридам.

Как и представители семейства 10, этот фермент имеет высокую молекулярную массу и низкий pI , а также небольшой сайт связывания субстрата, примерно четыре субсайта, с каталитическим центром посередине.

Общей чертой этой эндоглюканазы I и ксиланазы семейства 11 является трёхмерная структура β -железного рулета и конечные продукты гидролиза [35]. Структурные различия заключаются в наличии четырёх коротких α -спиральных сегментов вместо одного и различия в типе и конформации аминокислотных остатков, выстилающих активный центр.

Фермент семейства 43 (XynD) был обнаружен у *Paen. polymyxa*. Он имеет молекулярную массу 64 кДа и предположительно сворачивается в структуру пятилопастного β -пропеллера. В качестве каталитических остатков были предложены глутамат и аспарат в центре длинной V-образной канавки, образованной на поверхности пропеллера [18]. Считается, что гидролиз субстрата осуществляется по механизму одиночного замещения.

Каталитические свойства

Ксиланазы, относящиеся к семействам 5, 7, 10 и 11, катализируют гидролиз по механизму двойного замещения с сохранением аномерной конфигурации.

Каталитическую функцию выполняют два глутаматных остатка, расположенные в активном центре на расстоянии 5,5 Å друг от друга. На начальной стадии первый глутамат действует как общий кислотный катализатор, протонируя субстрат, в то время как второй выполняет нуклеофильную атаку, которая приводит к отщеплению уходящей группы и образованию промежуточного соединения – α -гликозильного фермента (происходит обращение конфигурации). На второй стадии карбоксильная группа первого глутамата действует как основание, отрывая протон от нуклеофильной молекулы воды, которая атакует аномерный углерод. Далее происходит второе замещение, при котором аномерный углерод снова проходит через переходное состояние, подобное иону оксокарбения, с образованием продукта с исходной конфигурацией аномерного центра (рисунок 7а).

Ксиланазы семейств 8 и 43 наоборот катализируют гидролиз по механизму одностадийного замещения с обращением аномерной конфигурации.

Каталитическими остатками предположительно являются глутамат и аспарат [18]. Исследования показали, что в активном центре они могут находиться на расстоянии от 7,5

до 9,5 Å друг от друга в зависимости от фермента, и это расстояние определяется не так строго, как в случае ферментов, катализирующих гидролиз с сохранением аномерной конфигурации [36]. Одна карбоксильная группа обеспечивает отщепление уходящей группы по механизму общего кислотного катализа, а вторая действует как основание, активируя нуклеофильный атом кислорода. При этом происходит разрыв связи между атомом углерода (рисунки 6а и 6б) и уходящей группой.

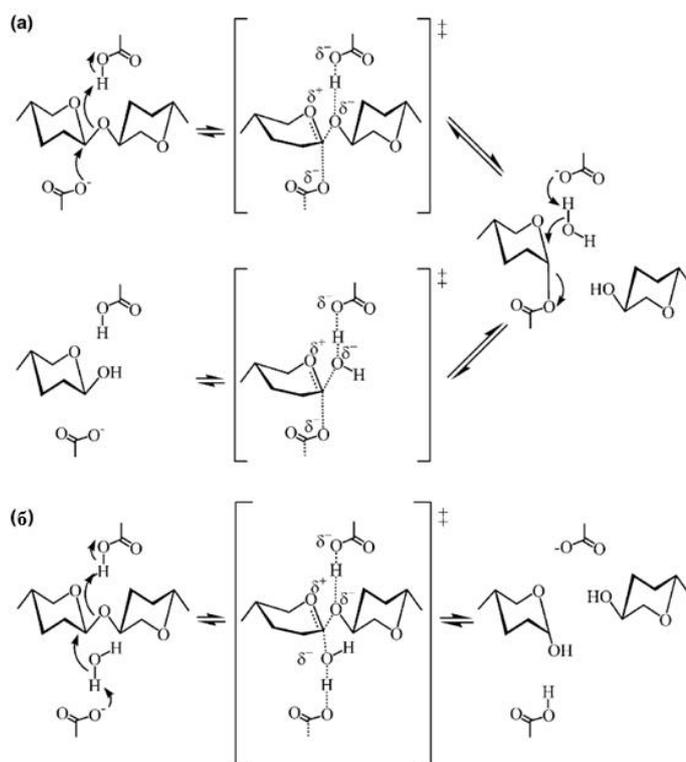


Рисунок 6. а) Механизм действия ксиланаз семейств 5, 7, 10, 11 с сохранением аномерной конфигурации; б) механизм действия ксиланаз семейств 8, 43 с обращением аномерной конфигурации.

В таблице 4 приведены каталитические параметры ксиланазы XylE *P. canescens*, принадлежащей семейству 10 гликозид-гидролаз, структура которой представлена на рисунке 8.

Таблица 4. Каталитические параметры XylE *P. canescens* [38].

Активность, ед/мг	K_M , г/л	k_{cat} , с ⁻¹	$t_{1/2}$ (70°C), мин
75 ± 4	3,3 ± 0,5	80 ± 6	3,8 ± 0,4

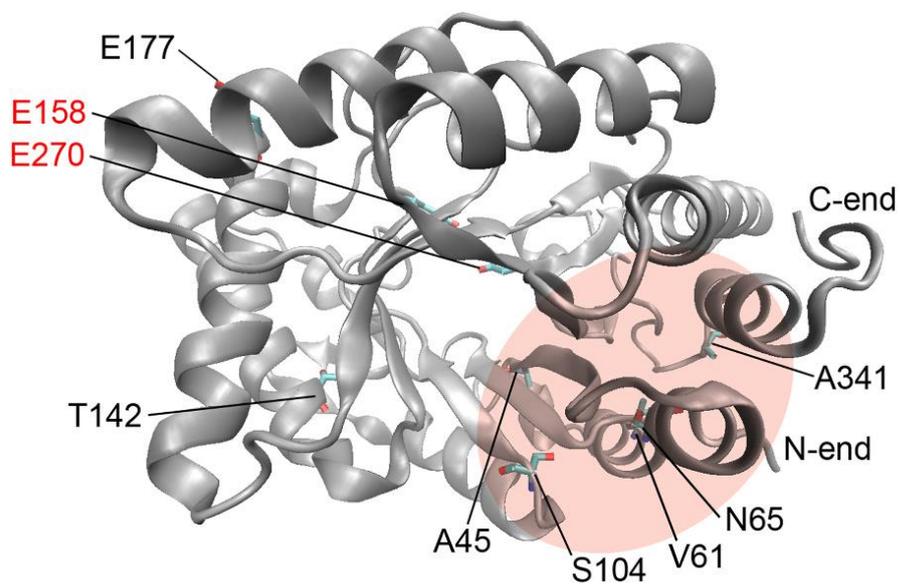


Рисунок 8. Структура ксиланазы XylE *P. canescens*. Красным обозначены каталитические аминокислотные остатки. Область N-конца и C-конца обозначена розовым [38].

1.2 Эндогликанызы

β-глюканы

β-глюканы – это класс полисахаридов, мономерными звеньями которых являются остатки β-D-глюкозы. Они могут быть соединены между собой 1,2-β-, 1,3-β-, 1,4-β-, 1,6-β-связями, и именно по этому признаку их удобнее всего классифицировать. β-глюканы могут различаться степенью полимеризации и степенью кристалличности, которая обусловлена количеством и протяжённостью линейных участков цепи.

1.2.1 Целлюлоза

Целлюлоза является наиболее распространённым в природе β-глюканом. По своим свойствам она сильно отличается от остальных β-глюканов, поэтому её зачастую рассматривают отдельно от всего класса.

Целлюлоза составляет большую часть клеточной стенки растений и обеспечивает её жёсткость. Она содержится в древесине, травянистых растениях, водорослях, оболочках семян плодов. Известно также о целлюлозе бактериального и животного происхождения, которую продуцируют некоторые ракообразные и улитки [39].

Целлюлоза представляет собой линейный полимер, в котором остатки глюкозы соединены между собой β-1,4-связями и не имеют боковых заместителей (рисунок 9). Степень полимеризации молекул целлюлозы варьируется от 2000 до 9000 в зависимости от источника и фазы роста растения – на ранних стадиях преобладают молекулы с более низкой степенью полимеризации [40].

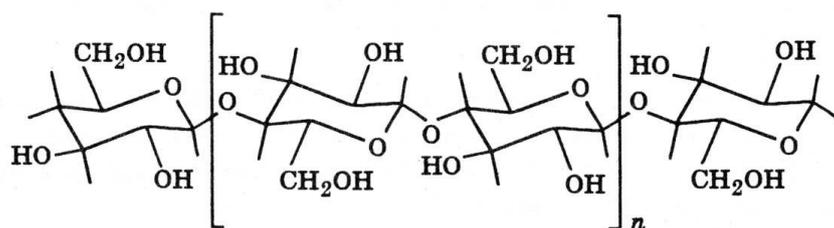


Рисунок 9. Структура молекул целлюлозы [39].

Благодаря такой структуре целлюлоза способна образовывать протяжённые области кристалличности, состоящие из микрофибрилл. В состав микрофибриллы входят соединённые водородными связями первичные фибриллы, а также лигнин и

гемицеллюлоза между ними (рисунок 10) [41]. Первичные фибриллы образованы 40–60 полимерными цепями целлюлозы, уложенными параллельно друг другу так, что все восстанавливающие концы расположены по одну сторону. Полимерные цепи в свою очередь также соединены между собой водородными связями. Многоточечное взаимодействие обеспечивает прочное связывание молекул и поддержание структуры. Области кристалличности чередуются с аморфными участками, в которых не сохраняется дальний порядок по трём направлениям, а присутствует лишь общая продольная направленность макромолекул. Аморфные участки более подвержены действию ферментов, и, как правило, именно они подвергаются химическим превращениям [42].

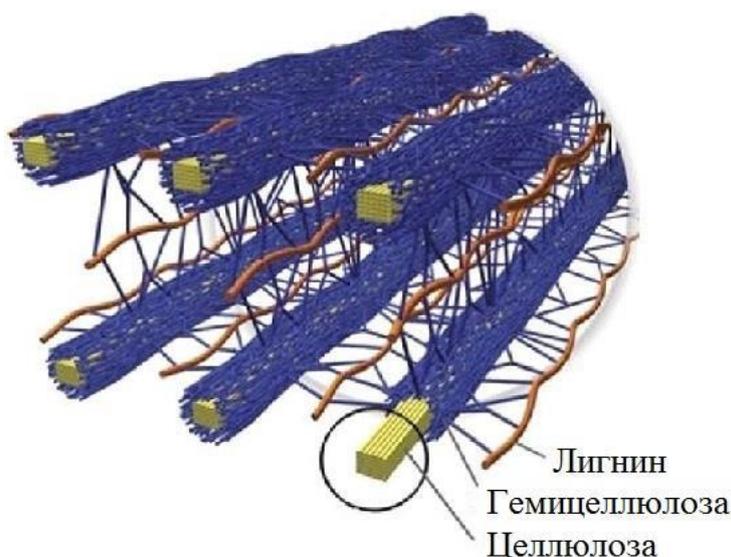


Рисунок 10. Микрофибриллы целлюлозы, связанные с гемицеллюлозой и лигнином [41].

1.2.2 Нецеллюлозные β -глюканы

Нецеллюлозные β -глюканы представлены многочисленными соединениями, которые продуцируют травянистые растения (злаки), водоросли, лишайники, грибы и бактерии. Они могут содержаться как в клеточной стенке (например, ламинарин водоросли *Laminaria cichoriodes*, пахиман гриба *Poria cocos*), так и в цитоплазме клеток (β -глюкан гриба *Phytophthora cinnamomi*), а также во внеклеточном пространстве (бактериальный курдлан из *Alcaligenes faecalis*, грибной β -глюкан из *Botrytis cinerea*) [43].

Молекулы нецеллюлозных β -глюканов могут быть линейными и разветвленными. При этом для боковых цепей разветвленных β -глюканов зачастую наблюдается регулярность включения. Полимерные молекулы образованы остатками β -D-глюкозы, соединенными

1,2-β-, 1,3-β-, 1,4-β-или 1,6-β-связями. В одной и той же цепи может реализовываться как один, так и несколько типов связи. Примеры некоторых β-глюканов с различными типами связей приведены в таблице 5 [44].

Таблица 5. β-глюканы из природных источников [44].

β-глюкан	Тип связи	Источники	Структура молекулы
Курдлан	1,3-β-	<i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Agrobacterium sp.</i> (бактерии)	Линейная
Пахиман		<i>Poria cocos</i> (грибы)	
Пустулан	1,6-β-	<i>Umbilicaria papullosa</i> , <i>Umbilicaria russica</i> (лишайники)	Линейная
Лихенан	1,3-β- ; 1,4-β-	<i>Cetraria islandica</i> <i>Usnea barbata</i> (грибы)	Линейная
Лентинан	1,3-β-; 1,6-β-	<i>Lentinula edodes</i> (грибы)	Разветвлённая
Ламинарин		<i>Eisenia bicyclis</i> (водоросли)	
Зимозан		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (грибы)	
Склеротан		<i>Sclerotium glaucum</i> (грибы)	
Шизофиллан		<i>Schizophyllum commune</i> (грибы)	

В зависимости от того, какие из перечисленных связей присутствуют в β-глюкане, его молекулы принимают определённую конформацию. Например, курдлан - β-глюкан с 1,3-β-связями (Рисунок 11) - закручивается в спираль. На рисунке 12 представлены три формы курдлана из *Agrobacterium sp. 10C3* [45].

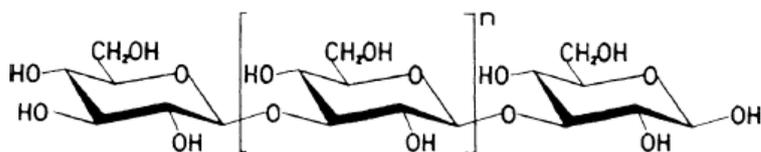


Рисунок 11. Структура курдлана [45].

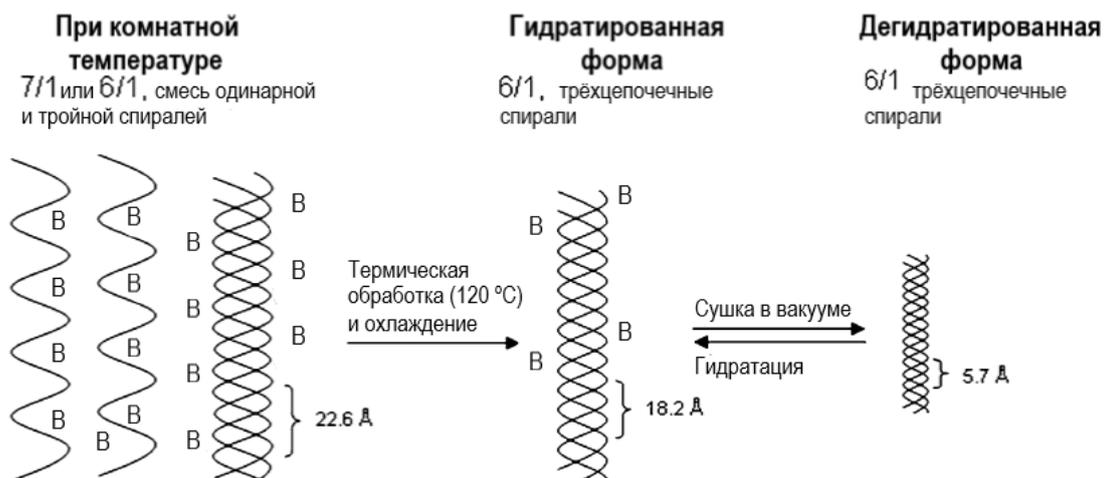


Рисунок 12. Схематическое представление структурных изменений курдлана при переходе в одну из возможных форм. В – молекулы воды [45].

При наличии связей другого типа структура может изменяться. Так, известен (1→3,1→6)-β-глюкан внутренней мембраны клеток *Bradyrhizobium japonicum*, имеющий циклическую форму (Рисунок 13) [45].

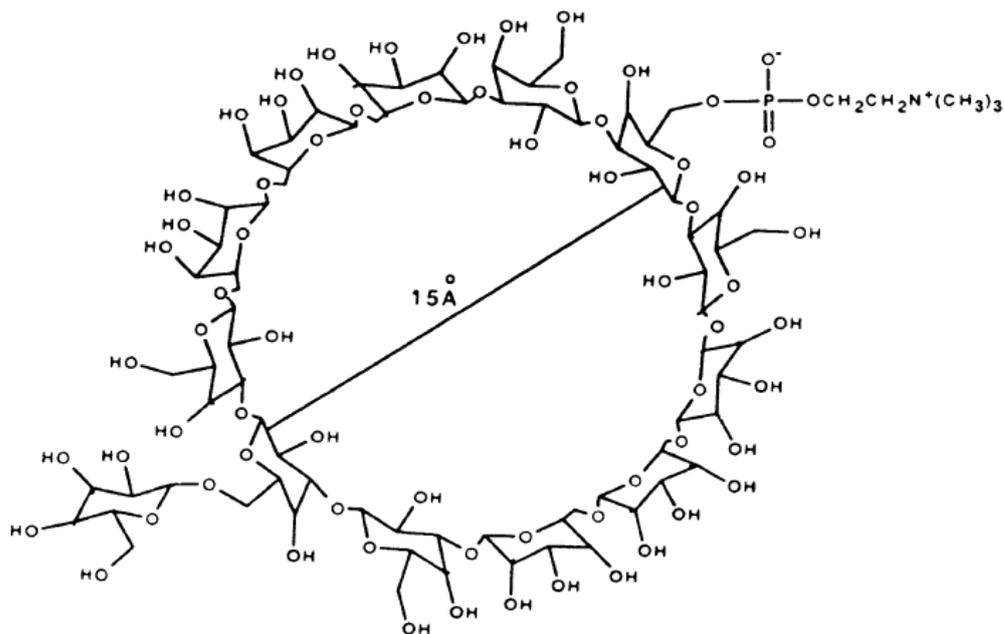


Рисунок 13. (1→3,1→6)-β-глюкан *Br. japonicum* [45].

β -Глюкан, выделенный из *Streptococcus pneumoniae type 37*, имеет (1 \rightarrow 3)- β -глюкановый остов с (1 \rightarrow 2)-связанными β -глюкопиранозильными боковыми ответвлениями на каждом глюкозильном остатке, что даёт скученную гребенчатую молекулярную организацию (рисунок 14) [45].

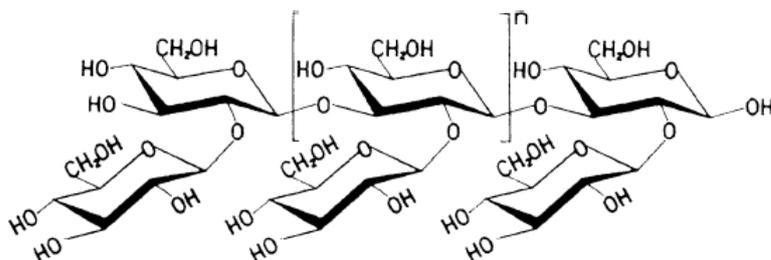


Рисунок 14. (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 2)- β -глюкан *Str. pneumoniae type 37*[45].

Степень полимеризации β -глюканов зависит от источника происхождения, но в общем она значительно ниже, чем у целлюлозы. Бактериальные β -глюканы состоят из коротких молекул, где степень полимеризации варьируется от 10 до 60. Растительные β -глюканы имеют более длинные полимерные цепи, состоящие из сотен глюкозильных остатков.

Многообразием структур β -глюканов обусловлено различие их физических свойств. Чем больше разветвлённость и ниже степень полимеризации молекул, тем выше растворимость β -глюкана в воде. При этом разветвлённые β -глюканы имеют повышенную склонность к гелеобразованию.

1.2.3 Эндоглюканызы

Эндо-1,4-глюканызы (КФ 3.2.1.4) — это гликозид-гидролазы, которые катализируют гидролиз 1,4- β -D-гликозидных связей в различных β -глюканах. В целлюлозе гидролизу преимущественно подвергаются её аморфные области, однако известны эндоглюканызы, способные гидролизовать кристаллическую целлюлозу.

Продуценты эндоглюканаз

Эндоглюканызы были обнаружены у бактерий и грибов. В таблице 6 приведены свойства эндоглюканаз грибного происхождения. В таблице 7 представлены пример бактериальных эндоглюканаз.

Классификация эндоглюканаз

Обнаруженные на сегодняшний день эндоглюканазы относятся к семействам 5-10, 12, 26, 44, 45, 48, 61 и 74 гликозилгидролаз (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>). Большинство из них

Таблица 6. Эндоглюканазы грибного происхождения [28], [46], [47], [48], [49], [50].

Источник	Фермент	Мол. масса, кДа	pI	Оптимальные значения	
				T, °C	pH
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	Egs	45,1	3,8	59	4,1
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	Egt	40,5	3,1	62	4,4
<i>Penicillium pinophilum</i>	Eg I	25	7,4	50-55	4,0-5,0
	Eg II	39	4,8	55-60	3,0-3,4
	Eg III	62,5	4,1	55	5,0
	Eg IV	54	3,7	50-55	5,0
	Eg V	44,5	4,0	65-70	4,8-5,2
<i>Trichoderma reesei</i>	Eg I	50	-	-	-
	Eg I rec	67	-	60	4,0
	Eg II	48	-	-	-
	Eg II rec	55	-	70	4,0
	Eg III	25	7,4	-	5,5-6,0
	Eg III rec	35-40	-	50-65	4,0
<i>Penicillium verruculosum</i>	Eg I (с ЦСМ)	70	4,0	-	-
	Eg I (без ЦСМ)	52	3,4	-	-
	Eg II a	39	2,0	-	-
	Eg II b	33	4,1	-	-

	Eg III	25	5,6	-	-
--	--------	----	-----	---	---

Таблица 7. Эндоглюканызы бактериального происхождения [51].

Источник	Ферменты различных семейств гликозид-гидролаз
<i>Clostridium thermocellum</i>	Cel9R
	Cel9I/Cel I
	CenC
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	CelF
	CelG
<i>Clostridium phytofermentans</i>	Cel9
<i>Clostridium cellulovorans</i>	EngZ
<i>Clostridium cellulosi</i>	Cel9A
<i>Clostridiaceae AN-C16 KBRB</i>	CelEdx16
<i>Cellulomonas fimi</i>	CenC
<i>Cellulomonas flavigena</i>	CBP105
<i>Thermobifida fusca</i>	Cel9A
<i>Paenibacillus arcinonensis</i>	Cel9B
<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	CHU_2103
<i>Bacillus subtilis BS-5</i>	EG5C-1
<i>Saccharophagus degradans 2-40</i>	Cel5H, Cel5G, Cel5J

являются представителями 5 и 9 семейств, при этом эндоглюканызы 9 семейства наиболее хорошо изучены.

Биохимические свойства

Эндоглюканызы семейства 9 и некоторые представители других семейств состоят из двух модулей, соединённых между собой линкером. Каталитический модуль имеет структуру бочонка (α/α)₆, а целлюлозосвязывающий модуль – структуру антипараллельного β -сэндвича. От первой до последней α -спирали каталитического модуля проходит расщелина, в которой находятся субсайты связывания субстрата (Рисунок 15). Нижняя часть щели постепенно переходит в целлюлозосвязывающий модуль, образуя плоскую поверхность (рисунок 16) [51].

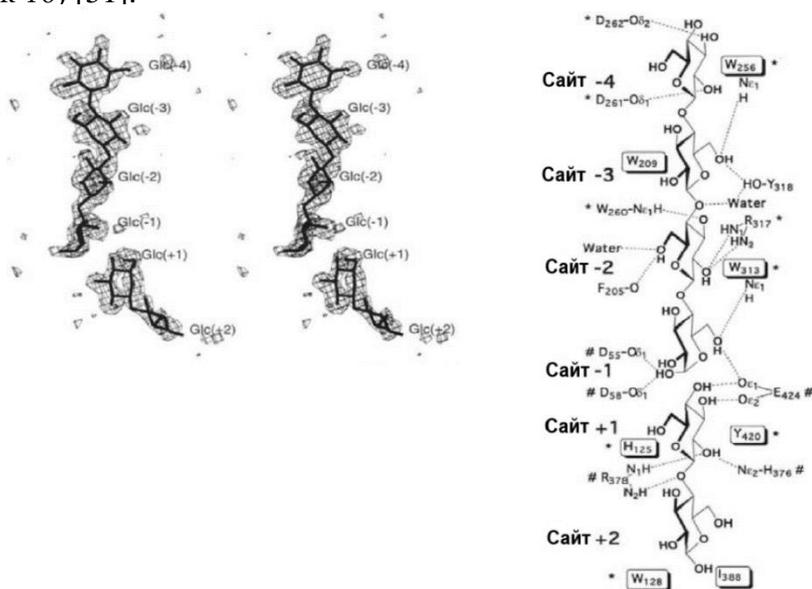


Рисунок 15. Связывание целлюлозы в каталитическом модуле эндоглюканызы Cel9A *Th. fusca* [51].

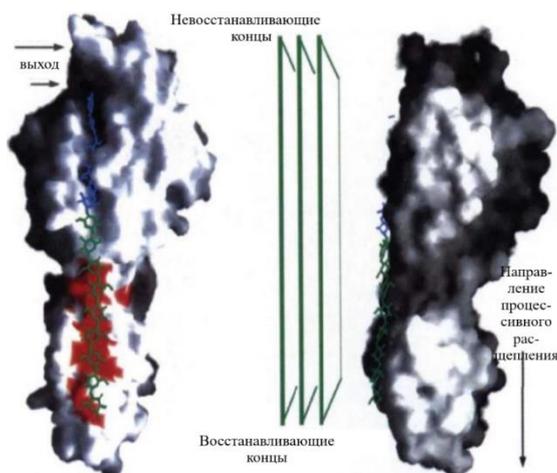


Рисунок 16. Молекулярная поверхность эндогликоканазы Cel9A *Th. fusca* [51].

Как правило, эндогликоканазы расщепляют длинные цепи, состоящие из 6 и более глюкозильных остатков. Продуктами гидролиза также являются крупные олигосахариды, вследствие чего при действии эндогликоканаз происходит быстрое снижение степени полимеризации субстрата [51].

Каталитические свойства

Гидролиз полисахаридов, катализируемый эндогликоканазами, происходит по процессивному механизму. Целлюлозосвязывающий модуль связывает полимерную цепь субстрата и «подаёт» её в каталитическую щель, где происходит ферментативное расщепление. Высвобождение продуктов гидролиза происходит с противоположного конца каталитического модуля (туннельно-нитевая модель). О механизме гидролиза, катализируемого эндогликоканазами без ЦСМ, имеется мало сведений. Большинство эндогликоканаз действуют с сохранением аномерной конфигурации.

В таблице 8 приведены каталитические параметры эндогликоканазы II Cel5A *P. verruculosum* [52], а также её структура на рисунке 17 [53].

Таблица 8. Каталитические параметры эндогликоканазы II Cel5A *P. verruculosum* [52].

Активность	$t_{1/2}$ (70°C), мин
по β -глюкану, ед/мг	
61 ± 6	46 ± 2

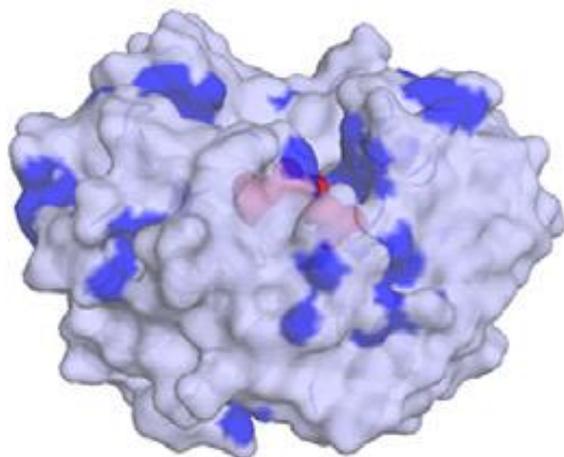


Рисунок 17. Эндоглюканаза II Cel5A *P. verruculosum* [53].

1.3 Фитазы

1.3.1 Фитаты

Фитатами называются соли фитиевой или *мио*-инозитол 1,2,3,4,5,6-гексакисфосфорной кислоты. *Мио*-инозитол гексакисфосфат представляет собой сложный эфир циклического шестиатомного спирта *мио*-инозитола (циклогексан-1,2,3,4,5,6-гексола) и шести остатков фосфорной кислоты (рисунок 18). *Мио*-конформация инозитола является наиболее энергетически выгодной по сравнению с другими восемью возможными стереоизомерами. Гидроксильная группа при С-2 расположена в аксиальном положении, а другие пять - в экваториальном [54]. Путём титрования фитиевой кислоты было установлено, что шесть протонов имеют $pK_a=2,18$, два - $pK_a=5,73$ и четыре - $pK_a=9,21$ [55].

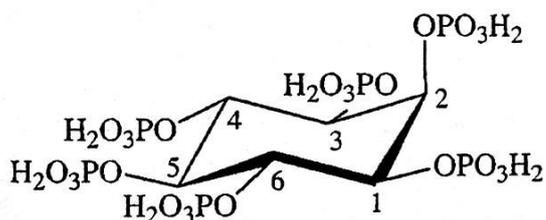


Рисунок 18. D-конфигурация *мио*-инозитол гексакисфосфорной кислоты [55].

Высокой химической активностью фосфатных групп фитиевой кислоты обусловлена её способность связывать катионы металлов, в том числе входящие в состав биомолекул, такие, как Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} (рисунок 19) [56]. При этом образуются прочные хелатные комплексы, практически не подверженные влиянию среды. Также фитаты способны образовывать комплексы с белками и пептидами за счёт связывания с положительно заряженными группами аминокислотных остатков. На их стабильность влияет природа и концентрация катиона, pH среды.

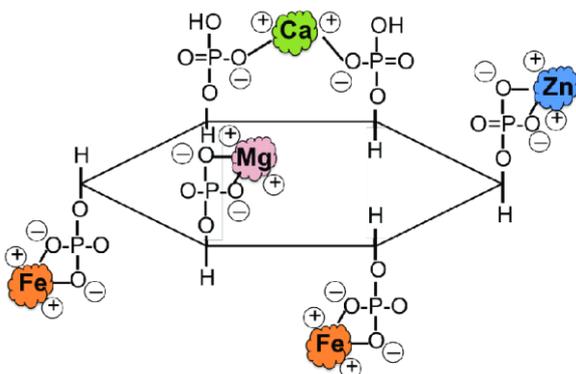


Рисунок 19. Хелатный комплекс *мио*-инозитол гексакисфосфата с ионами кальция, магния, цинка и железа [56].

Фитаты являются основной формой инозитолфосфатов в природе и главными запасующими фосфор соединениями в составе живых организмов. Наибольшее содержание фитатов обнаружено в семенах, особенно злаковых и бобовых культур, а также орехах. При этом на долю фитатов приходится от 50 до 80% всего запасённого фосфора (таблица 9), который необходим в больших количествах для включения в состав АТФ на этапе проращивания и дальнейших стадиях роста и развития. Вегетативные части растений содержат меньшие количества фитата [57].

Таблица 9. Содержание фитата в семенах растений [57].

Тип семян	Культура	Фосфор фитата		Фитат, % от сухого веса
		% от общего	% от сухого веса	
Масличные	Конопля	-	0.91	3.22
	Подсолнечник	77.0	0.57	2.01
	Хлопчатник	74.5	0.74	2.64
	Клещевина	62.2	0.40	1.40
	Арахис	70.0	0.32	1.13
	Лён	60.5	0.29	1.03
	Грецкий орех	23.5	0.12	0.41
Крахмалистые	Пшеница	70.0	0.43	1.52
	Ячмень	63.0	0.21	0.74
	Рис	68.5	0.24	0.85
	Сарго	50.0	0.20	0.71
	Кукуруза	88.0	0.27	0.96
	Овёс	62.0	0.23	0.80
Белковые	Горох	10.8	0.11	0.40
	Чечевица	38.3	0.09	0.32
	Соя	50.3	0.40	1.40

1.3.2 Фитазы

Фитазы (*мио*-инозитолгексакисфосфат фосфогидролазы, КФ 3.1.3.8, КФ 3.1.3.72, КФ 3.1.3.26) – это группа ферментов, катализирующих пошаговый гидролиз монофосфоэфирных связей *мио*-инозитолгексакисфосфата с образованием неорганического фосфата (в случае гидролиза хелатных комплексов с металлами или аминокислотными остатками – соответствующего фосфата) и пента-, а затем тетра-, три-, ди- и моноэфиров инозитола. Как правило, фитазы действуют стереоспецифично, и предпочтительнее дефосфолируют экваториальные группы [58].

Продуценты фитаз

Существуют исследования, посвящённые изучению фитаз растительного и животного происхождения. Например, фитазная активность была обнаружена в зёрнах ржи, ячменя,

кукурузы, риса. Фитазы животных организмов представлены ферментами желудочно-кишечного тракта жвачных животных, крыс, человека.

Однако наиболее пристальное внимание учёных на сегодняшний день привлекают микробные фитазы – бактериальные и грибные. Большая часть известных фитаз продуцируется микроскопическими грибами, такими, как *Agrocybe pediades*, *A. niger*, *P. caseolicolum*, *Rhizopus oligosporus*, *Sporotrichum thermophile* и др. Бактериальными продуцентами фитаз являются *Aerobacter aerogenes*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus amylovorus*, *Selenomonas ruminantium* и др.

Классификация фитаз

Существует несколько способов классификации фитаз по следующим признакам: сайт инициации дефосфорилирования фитата, оптимальная область рН действия ферментов, биохимические свойства и механизмы катализа.

На основании сайта инициации дефосфорилирования фитата фитазы принято разделять на три группы.

Первая и самая обширная группа — это 3-фитазы, или мио-инозитолгексакисфосфат-3-фосфогидролазы (КФ 3.1.3.8). Они иницируют дефосфорилирование фитата в С3-положении с образованием инозитолтрифосфата в качестве конечного продукта. Её представители являются ферментами микробного происхождения.

Вторая группа представлена растительными 5-фитазами (мио-инозитолгексакисфосфат-5-фосфогидролазы (КФ 3.1.3.72)), иницирующими дефосфорилирование фитата в С5-положении.

Третья группа включает 6-фитазы бактериального и растительного происхождения (мио-инозитолгексакисфосфат-6-фосфогидролазы (КФ 3.1.3.26)), иницирующие дефосфорилирование фитата в положении С6 [56].

По рН-оптимуму активности выделяют кислые и щелочные фитазы. Оптимум действия кислых фитаз находится в диапазоне рН3,0–5,5. Кислые фитазы обладают широкой субстратной специфичностью, поэтому они способны гидролизовать фитаты до мио-инозитол монофосфата, высвобождая пять фосфатных групп. Согласно исследованиям [56], возможен даже полный гидролиз до мио-инозитола.

Щелочные фитазы проявляют максимум активности в диапазоне рН7,0–8,0. Они обладают строгой субстратной специфичностью и способны катализировать отщепление лишь трёх фосфатных групп из шести с образованием *мио*-инозитол трифосфата [56].

Основываясь на различиях биохимических свойств и механизмов катализа, выделяют четыре класса фитаз: гистидиновые кислые фосфатазы, цистеиновые фосфатазы, пурпурнокислые фосфатазы и β -пропеллерные фитазы.

Гистидиновые кислые фосфатазы

Гистидиновые кислые фосфатазы являются наиболее хорошо изученным и обширным классом фитаз – к нему относится большая часть ферментов растительного, бактериального и грибного происхождения [59]. Большинство из них имеют мономерную структуру, но некоторые являются тетрамерными белками, например, фитаза *A. niger* [60]. Большую роль в формировании и сохранении третичной структуры гистидиновых кислых фосфатаз играют многочисленные дисульфидные мостики и высокая степень гликозилирования. От гликозилирования также зависит специфическая активность ферментов и их термостабильность [61].

Среди гистидиновых кислых фосфатаз есть множество представителей, обладающих широкой субстратной специфичностью и способных гидролизовать не только фитаты, но и другие фосфорилированные соединения [62].

Активность гистидиновых кислых фосфатаз по фитату может сильно отличаться внутри группы, несмотря на общую аминокислотную последовательность активных центров ферментов и общий для них механизм катализа [63]. Гидролиз фитата протекает по «пинг-понг» механизму через образование фосфорилированного фермента в качестве интермедиата. Остаток гистидина на N-конце активного центра выполняет функцию нуклеофила, на который переносится фосфатная группа субстрата. Затем аспарат C-конца активирует молекулу воды, которая отщепляет фосфатную группу, за счёт чего происходит высвобождение фосфата и регенерация фермента [64].

Цистеиновые фосфатазы

Группа цистеиновых фитаз изучена мало. Её представители были обнаружены у бактерий, входящих в состав микробиоты жвачных животных. Ферменты этой группы имеют в своём составе консервативную цистеинсодержащую P-петлю, которая участвует в связывании субстрата и определяет специфичность фермента. Рядом с петлёй расположен

активный сайт, осуществляющий каталитическую функцию. Фитазы, принадлежащие этой группе, дефосфорилируют фитат до мио-инозитол (2,4)-дифосфата. Помимо фитата они способны гидролизовать другие фосфорилированные субстраты.

Пурпурнокислые фитазы

Пурпурнокислые фитазы были обнаружены у животных, растений, грибов и бактерий. В отличие от других фитаз, пурпурнокислые фитазы являются металлозависимыми ферментами. В состав активного центра входят два иона металла, одним из которых, как правило, является ион Fe^{3+} , придающий ферментам пурпурную окраску. В качестве второго иона обычно выступают ионы Mn^{2+} , Zn^{2+} или Fe^{2+} [65].

При сравнении структур и аминокислотных последовательностей различных пурпурнокислых фитаз наблюдалась высокая гомология среди растительных ферментов и фитаз, выделенных из животных тканей. Однако между этими группами есть значительные различия в строении. Так, растительные пурпурнокислые фитазы по большей части имеют димерную пространственную структуру, а ферменты животного происхождения являются мономерными белками [65]. Большинство пурпурнокислых фитаз обладают широкой субстратной специфичностью [58].

β -пропеллерные фитазы

β -пропеллерные фитазы являются единственным классом фитаз, активных в щелочной области pH. Их продуцируют растения, грибы, цианобактерии и археи [66]. β -пропеллерные фитазы содержат в структуре β -складчатые слои. Представители этого класса фитаз проявляют активность только в присутствии ионов Ca^{2+} . В активном центре содержатся множество центров связывания ионов Ca^{2+} , которые при гидролизе фитата образуют мостики с оксианионами двух соседних фосфатных групп [67].

Ещё одной характерной особенностью этой группы является строгая субстратная специфичность. β -пропеллерные фитазы способны гидролизовать только фитаты до мио-инозит трифосфата, причём предпочтительнее происходит дефосфорилирование фитата кальция [68].

Биохимические свойства

В природе существуют как низкомолекулярные (~18 кДа), так и высокомолекулярные фитазы (~60 кДа). Известны фитазы, имеющие молекулярную массу 214-230 кДа (грибная

фитаза из *A. terreus*) и 490 кДа (дрожжевые фитазы из *Schwanniomyces occidentalis* и *Sac. castellii*).

Для ферментов бактериального происхождения характерны слабокислые и нейтральные значения рI, а для грибных фитаз – кислые.

Температурный оптимум активности большинства фитаз находится в районе 45-55°C, однако известны фитазы, полученные из термофильных микроорганизмов (например, фитаза из *A. terreus*) и действующие в области высоких температур (70°C), а также ферменты с пониженным значением температурного оптимума (фитаза *Aer. aerogenes* – 25°C). Некоторые фитазы обладают повышенной термостабильностью, и наиболее часто это наблюдается у β-пропеллерных фитаз.

Большинство фитаз грибного происхождения в значительной степени гликозилированы (около 30% по массе составляет углеводная часть), что обеспечивает их повышенную термостабильность и устойчивость к действию протеаз. Основные свойства некоторых фитаз представлены в таблице 10 [57].

Таблица 10. Биохимические свойства фитаз [57].

Источник	рI	Mr, кДа	рН _{опт}	T _{опт} , °C
<i>Bacillus subtilis</i>	6,25	38	6,0-6,5	60
<i>Escherichia coli</i>	7,37, 7,52/ 6,5-6,3	42-44,7	4,5	55-60
<i>Aspergillus terreus</i> 9A1 PhyA	4,97, 4,93	61	5,5	50
<i>Aspergillus terreus</i> CBS	<4	82	5,5	45
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 3135 PhyA	5,0-5,4	66-85	2,5; 5,5	
<i>Myceliophthora</i> <i>thermophile</i> PhyA	4,83, 4,73 4,63, 4,55	63	5,5	45

Каталитические свойства

Механизмы катализа, характерные для фитаз различных классов, а также субстратная специфичность были упомянуты выше при обсуждении особенностей этих групп. Необходимо добавить, что на активность фитаз оказывают негативное влияние органические соединения, способные связывать свободные SH-группы белка.

Ингибиторами также являются такие анионы, как фосфат, фторид, ванадат. β -пропеллерные кальций-зависимые фитазы инактивируются сильными хелатирующими агентами, например, ЭДТА. В некоторых случаях наблюдалось ингибирование субстратом [57].

В таблице 11 представлены каталитические параметры некоторых фитаз из различных источников [57].

Таблица 11. Каталитические параметры фитаз из различных источников [57].

Источник	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	Ссылка
<i>Escherichia coli</i> P2	0.103	6209	[33f]
<i>Aspergillus ficuum</i> NRRL 3135	0.027	348	[10, 130, 146]
phyA	0.103	628	
phyB			
<i>Rhizopus oligosporus</i> ATCC 22959	0.0104	51	[146]
<i>Lupinus albus</i> Var. Amiga LP11	0.08	523	[142]
LP12	0.3	589	
LP2	0.13	533	
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 3135	0.040	216	[10]

1.4 Применение ксиланаз, эндоглюканаз и фитаз в современных биотехнологических процессах

Поскольку ксиланазы и эндоглюканазы действуют на субстраты, входящие в состав большинства растений, эти ферменты находят широкое применение в гидролизе возобновляемой растительной биомассы – ключевом этапе многих промышленных процессов. Например, гидролиз возобновляемой растительной биомассы проводится при получении биотоплива – альтернативного источника энергии. Также ксиланазы и эндоглюканазы применяются в целлюлозно-бумажной промышленности для отбеливания целлюлозы, в текстильном производстве для обработки тканей [12]. В пищевой промышленности ксиланазы и эндоглюканазы применяются при хлебопечении, а фитазы – в предварительной обработке растительного сырья при производстве различных продуктов питания, поскольку человеческий организм не способен расщеплять фитаты, содержащиеся в большом количестве в бобах и семенах. Кроме того, фитазы используются в медицине за счёт их антиоксидантных, антиканцерогенных свойств и способность оказывать противовоспалительное и гипогликемическое действие.

Таким образом, все вышеперечисленные ферменты активно используются в современных биотехнологических процессах, но в последнее время они получили новое комплексное применение в кормовой промышленности.

Злаковые культуры (пшеница, рожь, овес, ячмень) являются основными компонентами кормов в животноводстве и птицеводстве. Содержащиеся в зёрнах злаковых фитаты и НПС, такие как целлюлоза, β -глюканы и ксиланы, не перевариваются в желудочно-кишечном тракте птиц и моногастричных животных из-за отсутствия ферментов, необходимых для их расщепления. НПС набухают в кишечнике, из-за чего повышается вязкость химуса и затрудняется доступ пищеварительных ферментов к питательным веществам кормов, что вызывает их неполное усвоение и ряд других негативных последствий. Кроме того, фитаты являются основной запасной формой фосфора в семенах растений, но фитатный фосфор недоступен для усвоения в связи с очень низким содержанием бактериальных фитаз микробиоты ЖКТ моногастричных животных, в результате основная часть фосфора (50-70%) входящего в состав кормов растительного происхождения, не усваивается [69].

Наиболее распространённым способом уменьшения негативного влияния НПС и фитатов кормов является использование ферментных препаратов (ФП). Включённые в корм ферменты, дополняя пищеварительную систему сельскохозяйственных животных и

птицы, обеспечивают конверсию НПС и высвобождение фосфора из фитатов, что в результате способствует улучшению использования питательных веществ рациона. В связи с этим актуально создание комплексных ферментных добавок для кормов, имеющих в своём составе три необходимых фермента: эндо-1,4- β -глюканазу (для разрушения НПС, см. раздел «Эндоглюканы»), эндо-1,4- β -ксиланазу (для разрушения НПС, см. раздел «Ксиланы») и фитазу (для высвобождения неорганического фосфора из фитиновой кислоты, см. раздел «Фитазы»). Использование комплексных ферментных препаратов ксиланаз, эндоглюканаз и фитаз в качестве добавок позволяет повысить усвояемость корма, а также снизить нагрузку фосфора на окружающую среду, связанную с потреблением сельскохозяйственными животными минеральных фосфатов [69].

1.5 Характеристика грибного штамма *P. verruculosum* как продуцента рекомбинантных ферментов.

Одним из основных источников технических ферментов являются микроорганизмы – к преимуществам их использования как продуцентов ферментов относятся сравнительно короткий цикл роста, простой состав питательных сред, способность к биосинтезу как индивидуальных ферментов, так и мультиферментных систем, а также генетическая стабильность [70]. Микроскопические грибы считаются наиболее перспективным источником технических ферментов – среди них можно найти продуценты практически всех необходимых для использования в промышленности или сельском хозяйстве ферментов [71].

В последние десятилетия был создан ряд эффективных грибных экспрессионных систем с высоким уровнем секреторной активности, что позволяет проводить биосинтез целевых ферментов или ферментных систем. Для этих целей используют грибы родов *Aspergillus*, *Hypocrea* (ранее *Trichoderma*), *Humicola insolens*, *M. thermophyla* (ранее *Cryosporium lucknowense*), *P. canescens* [72].

Из дикого целлюлозолитического штамма *P. verruculosum* WA30 методом ступенчатого мутагенеза и последующей селекции был получен высокопродуктивный штамм *P. verruculosum* B221-151 [73], из которого в дальнейшем также путём мутагенеза был получен реципиентный штамм *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$), сохранивший высокую секреторную способность до 50-60 г/л внеклеточного белка. Этот штамм является ауксотрофом с дефектом в гене *niaD*, кодирующем нитратредуктазу, которая принимает участие в ассимиляции нитратного азота (это используется в качестве селекционного признака при скрининге рекомбинантных штаммов). Штамм *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$) отличался редуцированным катаболизмом глюкозы за счет случайной мутации в репрессоре CreA, что позволяло культивировать его на среде с глюкозой, а также в режиме с подпиткой глюкозой. Биосинтез ферментов штамма индуцировался целлюлозой и целлоолигосахаридами [74].

Важной особенностью реципиентного штамма *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$) является то, что он сохраняет способность продуцировать комплекс внеклеточных целлюлаз (целлобиогидролазы и эндоглюканазы) с высокой активностью, превосходящей аналоги, получаемые при использовании штаммов рода *Hypocrea*, в том числе применяемые в промышленности [75]. Биосинтез ферментов индуцируют целлюлоза и целлоолигосахариды.

Генетическая конструкция для обеспечения экспрессии целевых гомологичных и гетерологичных генов в клетках реципиентного штамма гриба *P. verruculosum* B1-537 (*ΔniaD*), используемого в качестве хозяина, содержит целевую кодирующую последовательность, функционально связанную с регуляторными элементами гена *cbh1*, ответственного за синтез целлюбиогидролазы-1 (ЦБГ1), - мажорного фермента, продуцируемого *P. verruculosum*. Эти элементы представляют собой промотор и терминатор гена *cbh1*, а сигнальный пептид зависит от выбора целевого белка.

Целлюлазный комплекс *P. verruculosum* может быть с успехом использован для биоконверсии возобновляемой целлюлозосодержащей биомассы и превращения её в глюкозу, а использование возможностей экспрессионной системы *P. verruculosum* позволяет изменять содержание тех или иных ферментов комплекса (или вводить в его состав новые ферменты), чтобы регулировать состав ферментного комплекса для максимально эффективной конверсии различных видов растительного сырья [74].

Реципиентный штамм *P. verruculosum*, таким образом, используется как платформа для получения комплексных ферментных препаратов, обладающих активностью по отношению к различным субстратам.

1.6 Улучшение свойств карбогидраз методами белковой инженерии.

Для промышленных биотехнологических процессов необходимо широкое разнообразие ферментов в большом количестве, однако выработка природными (дикими) штаммами продуцентов ограничена, как правило, их потребностями в питании. Кроме того, зачастую условия производств требуют повышенной стабильности ферментов, изменения рН- и температурных оптимумов действия, а также субстратной специфичности. Поэтому природные штаммы подвергаются изменениям с целью улучшения свойств секретируемых ими ферментов. Такие модификации осуществляются методами генетической инженерии.

В генетической инженерии карбогидраз применяются несколько подходов. Один из них - метод рационального дизайна. Его используют для направленного изменения свойств ферментов путём прогнозирования точечных аминокислотных замен и осуществления сайт-направленного мутагенеза.

Необходимые замены аминокислотных остатков прогнозируют на основе кристаллографических данных о пространственном строении белка или множественном выравнивании его аминокислотной последовательности с последовательностями уже изученных белков [76]. Подобный анализ даёт информацию об аминокислотных остатках, участвующих в связывании фермента и субстрата, катализе и поддержании трёхмерной структуры фермента. Также при выборе мест для внесения модификаций учитывается механизм связывания с субстратом и его свойства. Например, для изменения свойств эндоглюканаз и β -глюкозидаз аминокислотные замены производятся, как правило, только в активном центре ферментов, так как субстратами для них служат растворимые полисахариды. В случае целлюлозогидролаз, которые катализируют расщепление нерастворимых полисахаридов, рациональный дизайн затрагивает не только активный центр фермента, но и целлюлозосвязывающий домен - участок на поверхности белковой глобулы, ответственный за связывание с нерастворимыми субстратами, а также петли вокруг активного центра и линкер, соединяющий каталитический и целлюлозосвязывающий домены.

Успешное применение данного метода позволяет изменять рН- и температурные оптимумы активности карбогидраз, понижать степень ингибирования продуктами реакций, увеличивать термостабильность [77]. Кроме того, этот метод позволяет изучать механизмы действия ферментов – выделять принципиально важные аминокислотные остатки и элементы пространственной структуры, играющие ключевую роль.

Другим применяемым генно-инженерным подходом является метод направленной эволюции. В отличие от рационального дизайна, аминокислотные замены в этом подходе не прогнозируются, а вносятся случайным образом. Затем проводится скрининг полученных мутантных форм для поиска положительных мутаций.

Преимуществом этого метода является возможность осуществления без использования данных о структуре фермента, механизме его действия и свойствах субстратов.

Недостатком же является то, что случайный характер внесения аминокислотных замен может давать сотни тысяч мутантных форм, скрининг которых необходимо провести.

Применение такого подхода целесообразно, когда можно быстро определять активность фермента и автоматизировать скрининг. Тем не менее, данный метод используется и позволяет увеличивать активность и стабильность карбогидраз [78].

Существует и третий генно-инженерный подход к улучшению свойств карбогидраз – направленная эволюция рационально-выбранного участка аминокислотной последовательности, синтез двух уже описанных методов. На основании данных о структуре белка проводится компьютерное моделирование, с помощью которого определяются наиболее вероятные для улучшения параметров ферментов участки модификаций. Таким образом удаётся сильно сократить количество мутантных форм для скрининга [79].

Большая часть карбогидраз являются гликозилированными ферментами, то есть с полипептидной цепью ковалентно связаны различные олигосахариды. Белковые глобулы гликозилированы либо по амидной группе остатка аспарагина (N-гликозилирование), либо по гидроксильной группе остатков треонина и серина (O-гликозилирование). Такие модификации могут защищать ферменты от действия протеаз, агрегации, повышают растворимость в водной среде, оказывают влияние на фолдинг и стабильность белковой глобулы, способность адсорбироваться на нерастворимом субстрате [80], однако роль гликозилирования карбогидраз нуждается в дальнейшем изучении. Сообщалось, что целлюлазы содержат сайты N-гликозилирования преимущественно в каталитическом домене и служат для поддержания структуры, в то время как линкер содержит сайты O-гликозилирования, необходимые для его защиты от протеаз [81]. Поэтому добавление/удаление сайтов гликозилирования с помощью аминокислотных замен является довольно распространённой модификацией, служащей не только для улучшения

свойств ферментов, но и изучения его влияния на каталитические и биохимические параметры.

После того, как был создан фермент с улучшенными свойствами, кодирующий его ген клонируют и осуществляют экспрессию гена. Экспрессия гена фермента осуществляется либо под контролем собственного промотора, либо под контролем промотора другого гена с высоким уровнем экспрессии.

II. Экспериментальная часть

2.1 Материалы

2.1.1 Ферментные препараты

При выполнении работы использовали сухие ФП (как лабораторные, так и промышленные), полученные с помощью новых рекомбинантных штаммов *P. verruculosum*, созданных на основе штамма-реципиента В1-537 путём клонирования целевых гомологичных и гетерологичных генов (неингибируемой эндо- β -1,4-ксилазазы Ху1Е *P. canescens*, собственной эндо- β -1,4-глюканазы Eg2 и фитазы PhуА *A. niger*, а также их термостабилизированными формами Ху1Естаб, Eg2стаб и PhуАстаб):

- комплексный ФП #3147 (производства завода «АгроФермент», Россия), обогащённый Ху1Е и Eg2;
- комплексный ФП #3353 (производства завода «АгроФермент», Россия), обогащённый Ху1Е и PhуА;
- комплексный ФП #3536 (производства завода «АгроФермент», Россия), обогащённый Eg2 и PhуА;
- комплексный ФП #3.694.1 (получен в ИНБИ РАН), обогащённый Eg2, Ху1Е и PhуА;
- комплексный ФП #3.693.4 (получен в ИНБИ РАН), обогащённый Ху1Естаб
- комплексный ФП #3.640.6 (получен в ИНБИ РАН), обогащённый Eg2стаб
- комплексный ФП #3.695.1 (получен в ИНБИ РАН), обогащённый PhуАстаб
- контроль - комплексный ФП #3.362.1 полученный (в ИНБИ РАН) на основе исходного штамма-реципиента В1-537

2.1.2 Субстраты

Для определения активностей ферментных препаратов использовали следующие субстраты: ксилан бука производства фирмы «Sigma» (США); натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) средней вязкости производства фирмы «Sigma» (США); β -глюкан ячменя производства фирмы «Sigma» (США); фитат натрия риса производства фирмы «Sigma» (США).

2.1.3 Прочие реактивы

В качестве калибровочного стандарта при определении концентрации белков в растворе методом Лоури использовали бычий сывороточный альбумин (БСА).

При изготовлении пластин ($70 \times 80 \times 0,75$ мм) с полиакриламидным гелем (ПААГ) для электрофореза в денатурирующих условиях (ДДС-ЭФ) с концентрирующим (4%) и элюирующим (12%) гелями использовали реактивы марки «electrophoresis grade» и наборы производства фирм «Reanal» (Венгрия), «Sigma» и «Bio-Rad» (США). Окраску белка в гелях производили красителем Coomassie-Brilliant Blue R-250 производства фирмы «Helicon» (Россия) в 25% трихлоруксусной кислоте. Перед электрофорезом исследуемые растворы ферментов предварительно обрабатывали 1% додецилсульфатом натрия (ДДС-Na) и 5% β -меркаптоэтанолом при 100°C в течение 15 мин.

В качестве стандартов для ДДС-ЭФ использовали смеси белков MW-SDS-70L (14-70 кДа) и MW-SDS-200 (30-200 кДа) производства «Sigma», включающие α -лактоальбумин (14,2 кДа), соевый ингибитор трипсина (20,1 кДа), гидролизованный бычий трипсиноген (24,0 кДа), карбоангидразу (29,0 кДа), глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу (36,0 кДа), овальбумин (45,0 кДа), БСА (66,0 кДа), фосфорилазу В (97,4 кДа) и β -галактозидазу (116,0 кДа).

Для приготовления буферных растворов использовали реактивы марок ХЧ, ЧДА и ОС.Ч. фирм «Реахим» (Россия), «ICN» (США) и «Sigma». Растворы, использовавшиеся в качестве элюентов для хроматографии, фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм и тщательно дегазировали.

2.1.4 Хроматографические сорбенты

Для проведения гель-проникающей хроматографии (ГПХ) использовали сорбенты Bio-Gel P-4 и P-60 фирмы «Bio-Rad» (США).

Для проведения анионообменной хроматографии использовали сорбент Source 15Q фирмы «Pharmacia» (Швеция).

Для проведения гидрофобной хроматографии использовали сорбент Source 15ISO фирмы «Pharmacia» (Швеция).

2.2 Методы

2.2.1 Определение концентрации белка

Содержание белка в пробах определяли модифицированным методом Лоури или по поглощению на длине волны 280 нм (A_{280}). В первом случае проводили калибровку, используя раствор БСА в качестве стандарта и принимая, что поглощение раствора БСА с концентрацией 1 г/л составляет 0,65 единиц оптического поглощения при использовании 1 см кюветы.

Для спектрофотометрических измерений использовали спектрофотометр Cary 50 UV-visible фирмы «Varian» (США).

2.2.2 ДДС-ЭФ и содержание целевых белков в ФП

Для проведения ДДС-ЭФ использовали пластины с ПААГ (4% концентрирующего и 12% разделяющего). Растворы ферментов предварительно обрабатывали раствором ДДС-Na и β -меркаптоэтанола при 100°C в течение 10 мин. ДДС-ЭФ проводили на приборе Mini Protean II «Bio-Rad» (США), согласно руководству к прибору. Окраску белковых полос проводили красителем Coomassie-Brilliant Blue G-250.

Гель сканировали и полученную фотографию анализировали с помощью программы GelAnalyzer2010a. По результатам этого анализа рассчитывали содержание целевых белков (%) в ФП.

2.2.3 Выделение и очистка ферментов

ГПХ

При проведении ГПХ на колонках с носителем Bio-Gel P-4 (1 x 10 см, объем 10 мл) белок элюировали 0,01 М ацетатным буфером, pH 5,0, (насос фирмы «Pharmacia») при скорости потока 1 мл/мин. Выход белка контролировали по A_{280} с помощью ячейки Pharmacia Monitor UV-1 фирмы «Pharmacia». Анализ собранных белковых фракций проводили методами ДДС-ЭФ, а также определяли специфическую активность по отношению к соответствующим субстратам.

Анионообменная хроматография

Анионообменную хроматографию проводили на жидкостном хроматографе среднего давления NGC Chromatography System фирмы «Bio-Rad» на колонке с носителем Source 15Q (объем 10 мл). Элюирование белков осуществляли с помощью 0,02 М Bis-Tris/HCl буфера, pH 6,8, в градиенте NaCl от 0 до 0,4 М. Анализ собранных белковых фракций проводили методами ДДС-ЭФ и определения их активности по отношению к соответствующим субстратам.

Гидрофобная хроматография

Гидрофобную хроматографию проводили на жидкостном хроматографе среднего давления NGC Chromatography System фирмы «Bio-Rad» на колонке с носителем Source 15ISO (объем 30 мл). Элюирование белков осуществляли с помощью 0,05 М Na-ацетатного буфера, pH 5,0, в обратном градиенте сульфата аммония от 1,7 до 0 М. Анализ собранных белковых фракций проводили методами ДДС-ЭФ и определения их активности по отношению к соответствующим субстратам.

После гидрофобной хроматографии часть белковой фракции, содержащей белок интереса, подвергали ГПХ на колонке с носителем Bio-Gel P-4 (1 x 50 см, объем 50 мл) для обессоливания и замены буфера на 50 мМ NH₄Ac, pH 5,5, после чего проводили лиофильную сушку белка на приборе Freeze Dryer Labconco фирмы «Labconco» (США).

2.2.4 Определение активностей

Определение активностей карбогидраз

Стандартные КМЦ-азную, ксиланазную и β-глюкканазную активности определяли по начальной скорости образования ВС (т.н. «минимизированным» методом Шомоди-Нельсона [82]) при гидролизе КМЦ, ксилана и β-глюкана. В общем случае, за единицу активности эндоглюкканаз или ксиланаз при гидролизе полисахаридов принимали такое количество фермента, которое необходимо для образования 1 мкМ восстанавливающих сахаров (ВС) за 1 минуту при действии на определенный субстрат при 50°C и при pH 5,0. Стандартная концентрация субстрата в случае полисахаридных субстратов в реакционной смеси была равна 10 г/л.

Определение активности фитаз [2]

Метод основан на количественном определении содержания неорганических фосфатов (PO₄), образующихся в результате действия фитазы на фитат натрия, путем их связывания

молибдатом натрия и восстановлением сульфата железа (II) с образованием окрашенного в синий цвет комплекса – молибденовой сини. За единицу фитазной активности принимают количество фермента, катализирующее гидролиз фитата натрия с образованием 1 мкМ неорганического фосфата за 1 минуту при действии на фитат натрия при температуре 40°C и при pH 5,0. Стандартная концентрация фитата натрия в реакционной смеси была равна $1,4 \cdot 10^{-3}$ моль/л, продолжительность гидролиза – 30 минут. Интенсивность окраски измеряли фотоколориметрическим методом при длине волны 750 нм. Концентрацию фосфат-ионов в растворе ($[PO_4]$) определяли по градуировочному графику, построенному как функция оптической плотности от молярной концентрации фосфатов:

$$[PO_4] = (D_{750} - 0,0202) * 0,1475,$$

где $[PO_4]$ – Концентрацию фосфат-ионов в растворе, г/л; D_{750} – оптическая плотность при длине волны 750 нм.

Фитазную активность затем рассчитывали по следующей формуле:

$$\frac{[PO_4] * 10^6 * R_{PC} * R_E}{M_{ф-та} * 10^3 * t_p} = [PO_4] * 2,45 * R_E,$$

где R_{PC} – разбавление ферментного препарата в реакционной смеси; R_E – предварительное разбавление ферментного препарата (до внесения в реакционную смесь); $M_{ф-та}$ – молекулярная масса фосфата (136).

2.2.5 Определение pH- и температурных оптимумов действия ферментов

Определение pH-профиля активности ферментов проводили, измеряя активность ферментов в диапазоне значений pH от 2 до 8, с шагом 0,5 единиц pH. Для создания растворов с заданным значением pH при определении pH-профиля активности ксиланаз и эндоглюканаз использовали универсальный буфер (смесь фосфорной, уксусной и борной кислот с концентрацией 0,04 М каждая; pH доводили до нужного значения 2 М раствором NaOH). Для создания растворов с заданным значением pH при определении pH-профиля активности фитаз использовали буфер глицин-HCl в интервале pH 2,2-3,6, ацетатный буфер в интервале pH 3,6-5,6, буфер TRIS-малеат в интервале pH 5,4-8,4. pH доводили до нужного значения 2 М раствором NaOH или концентрированным раствором HCl. На графиках pH-зависимости активности ферментов отражали значение pH реакционной смеси, измеренное непосредственно в реакционной смеси.

Определение температурного профиля активности ферментов проводили, измеряя активность ферментов при различных температурах (от 4°C до 80°C, с шагом 5°C) в рН-оптимальности действия ферментов.

В качестве субстратов использовали: КМЦ (для эндоглюканазы), ксилан бука (для ксиланазы), фитат натрия риса (для фитазы).

Результаты измерений отображали в процентах от максимального значения активности в рН- или температурном оптимальности.

2.2.6 Изучение влияния температуры на активность ферментов в растворе

Растворы ФП (10 г/л) или гомогенных ферментов инкубировали при заданной температуре в 0,1 М Na-ацетатном буфере, рН5,0, общий объём инкубируемой смеси - 2 мл. С начала инкубации через равные промежутки времени (15-30 мин) отбирали аликвоты инкубируемых растворов и измеряли активность ферментов по соответствующему субстрату. Результаты отображали в виде зависимости остаточной активности (в процентах от исходной) от времени инкубирования при данной температуре и рН5,0.

При исследовании поведения ферментов в условиях распылительной сушки (т.н. «термошока») - кратковременного воздействия высоких температур (70 и 80°C) на растворы фермента – опыты вели аналогичным образом, но временные интервалы между отборами проб из инкубируемых растворов составляли 15-30 сек.

2.2.7 Изучение стабильности сухих ФП и гомогенных ферментов при высокой температуре.

Сухие ФП или лиофильно высушенные гомогенные ферменты инкубировали при 70, 80, 90, 100°C. Через 5, 15, 30, 60 минут от начала инкубации отбирали аликвоты порошков и измеряли активность по соответствующим субстратам (КМЦ, ксилан бука, фитат натрия риса). Результаты отображали в виде зависимости остаточной активности (в процентах от исходной) от времени инкубирования при данной температуре.

III. Результаты и их обсуждение

3.1 Активность новых ФП

Объектами исследования в данной работе служили ФП с увеличенной активностью ферментов, разрушающих НПС и фитаты (неингибируемая эндо- β -1,4-ксилаза XylE *P. canescens*, собственная эндо- β -1,4-глюканаза Eg2 и фитаза PhyA *A. niger*, а также их термостабильные формы Eg2стаб, XylEстаб и PhyAстаб), полученные на основе рекомбинантных штаммов мицелиального гриба *P. verruculosum*. В качестве объектов, обогащенных нестабилизированными формами эндоглюканазы, ксиланазы и фитазы, были выбраны комплексные ФП, содержащие «дуплеты» PhyA + XylE, Eg2 + XylE, PhyA + Eg2 производства завода «АгроФермент», а также лабораторный ФП (произведён нашими коллегами в ИНБИ РАН), содержащий «триплет» PhyA + Eg2 + XylE. Для изучения свойств термостабильных форм ферментов использовали лабораторные препараты, также полученные нашими коллегами в ИНБИ РАН. Там же на основе исходного штамма-реципиента В1-537 был получен контрольный ФП, используемый в качестве сравнения.

В выбранных ФП и препарате, полученном на основе исходного штамма-реципиента В1-537, определили содержание белка и активность по ключевым субстратам. Результаты представлены в таблице 12. Как видно из таблицы, новые ФП проявляют высокую активность по отношению к различным НПС (целлюлозе, β -глюкану и ксилану), а также к фитату, причём активность по КМЦ и ксилану в 2-10 раз превышала таковую для ФП, полученного с помощью реципиентного штамма В1-537. Активность по фитату достигала 55 000 ед/г, в то время как активность по фитату у контрольного препарата отсутствует.

Таблица 12. Характеристики новых комплексных ФП

а) Общая активность, ед/г

Препарат	Состав	Белок, Лоури, мг/г	Общая активность, ед/г			
			КМЦ (ШН)	β -Глюкан (ШН)	Ксилан (ШН)	Фитат Na
			Условия проведения ферментативной реакции			
			50°C, pH5,0	50°C, pH5,0	50°C, pH5,0	37°C, pH5,0

#3147	Eg2 + XylE	740 ± 38	17686 ± 884	16280 ± 814	28934 ± 1447	0
#3536	PhyA + XylE	910 ± 47	11375 ± 569	10829 ± 541	47320 ± 2366	54964 ± 2748
#3353	PhyA + Eg2 + XylE	703 ± 37	2250 ± 113	2109 ± 105	29737 ± 1487	12092 ± 605
#3.694.1	PhyA + Eg2	694 ± 36	3123 ± 156	2429 ± 121	5691 ± 285	43514 ± 2176
#3.693.4	XylEстаб	812 ± 41	3248 ± 162	3004 ± 150	38489 ± 1924	0
#3.640.6	Eg2стаб	725 ± 36	23997 ± 1120	21460 ± 1073	5583 ± 279	0
#3.695.1	PhyAстаб	653 ± 33	8620 ± 431	7052 ± 353	5420 ± 271	43947 ± 2197
#3.362.1	Контрольный препарат (на основе штамма- реципиента В1- 537)	587 ± 31	2172 ± 109	1820 ± 91	9627 ± 481	0

б) Удельная активность, ед/мг белка

Препарат	Состав	Белок, Лоури,	Удельная активность, ед/мг белка
----------	--------	------------------	----------------------------------

		мг/г	КМЦ (ШН)	β-Глюкан (ШН)	Ксилан (ШН)	Фитат Na
			Условия проведения ферментативной реакции			
			50°C pH5,0	50°C pH5,0	50°C pH5,0	37°C pH5,0
#3147	Eg2 + XylE	740 ± 38	23,9 ± 1,1	22,0 ± 1,1	39,1 ± 1,8	0
#3536	PhyA + XylE	910 ± 47	12,5 ± 0,6	11,9 ± 0,6	52,0 ± 2,4	60,4 ± 3,1
#3353	PhyA + Eg2 + XylE	703 ± 37	3,2 ± 0,2	3,0 ± 0,1	42,3 ± 1,9	17,2 ± 0,9
#3.694.1	PhyA + Eg2	694 ± 36	4,5 ± 0,2	3,5 ± 0,2	8,2 ± 0,4	62,7 ± 3,2
#3.693.4	XylEстаб	812 ± 41	4,0 ± 0,2	3,7 ± 0,2	47,4 ± 2,4	0
#3.640.6	Eg2стаб	725 ± 36	33,1 ± 1,7	29,6 ± 1,5	7,7 ± 0,4	0
#3.695.1	PhyAстаб	653 ± 33	13,2 ± 0,7	10,8 ± 0,5	8,3 ± 0,4	67,3 ± 3,4
#3.362.1	Контрольный препарат (на основе штамма- реципиента В1- 537)	587 ± 31	3,7 ± 0,2	3,1 ± 0,1	16,4 ± 0,8	0

3.2 Компонентный состав новых ФП

Для изучения компонентного состава новых комплексных ФП и сравнения с препаратом, полученным на основе исходного штамма-реципиента В1-537, был проведён их ДДС-ЭФ в ПААГ с последующим анализом содержания целевых белков (%) с помощью программы GelAnalyzer2010a. Как видно из рисунка 20 и таблицы 13, все новые препараты значительно обогащены ферментами интереса по сравнению с исходным: широкие белковые полосы в районе 63 кДа, отсутствующие у препарата В1-537, соответствуют PhуА (40-50% от общего содержания белка в препарате); полосы в районе 37 кДа, присутствующие в виде минорной (1,4%) полосы в препарате В1-537, – гомологичной Eg2 (16-17% от общего количества белка); а полосы в районе 40 кДа – ХylЕ (48-63% от общего количества белка). ФП, обогащенные стабилизированными формами ферментов, содержали около 58% Eg2стаб, 70% ХylЕстаб, 65% PhуАстаб и 6-20% ЦБГ от общего содержания белка. При этом содержание «балластных» с точки зрения применения в качестве кормовых добавок ферментов в препаратах низкое, а доля «полезных» ЦБГ осталась высокой (17-30%), тогда как ФП, полученный на основе штамма-реципиента В1-537, содержал 60% ЦБГ, и не содержал ХylЕ и PhуА.

Таблица 13. Содержание (%) рекомбинантных ферментов в комплексных ФП

Препарат	Состав	Содержание фермента в ФП, %			
		Eg2/Eg2стаб (37 кДа)	ХylЕ/ХylЕстаб (40 кДа)	PhуА/PhуАстаб (63 кДа)	ЦБГ
#3147	Eg2 + ХylЕ	26/0	25/0	0/0	10
#3536	PhуА + Eg2	50/0	0/0	24/0	10
#3353	PhуА + ХylЕ	0/0	33/0	36/0	8
#3.694.1	PhуА + Eg2 + ХylЕ	13/0	23/0	29/0	6
#3.693.4	ХylЕстаб	0/0	0/70	0/0	15
#3.640.6	Eg2стаб	0/58	0/0	0/0	14
#3.695.1	PhуАстаб	0/0	0/0	0/65	20
#3.362.1	Контроль (ФП на основе штамма- реципиента В1-537)	1,4/0	0/0	0/0	60

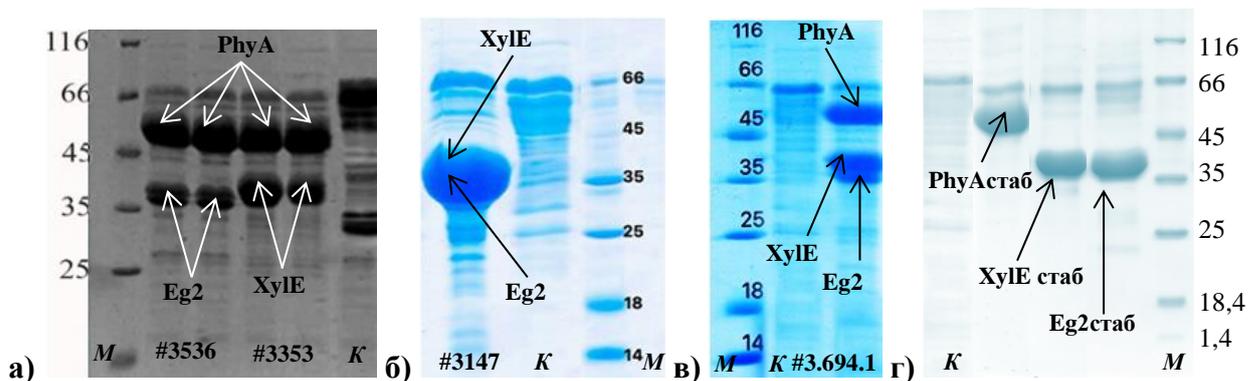


Рисунок 20. ДДС-ЭФ ФП, содержащих «дуплеты» PhyA + XylE, PhyA + Eg2 (а); Eg2 + XylE (б); «триплет» PhyA + Eg2+ XylE (в), а также PhyАстаб, XylЕстаб, Eg2стаб. В качестве контрольного препарата (К) использовали ФП, полученный на основе штамма-реципиента В1-537. М – стандартный маркер.

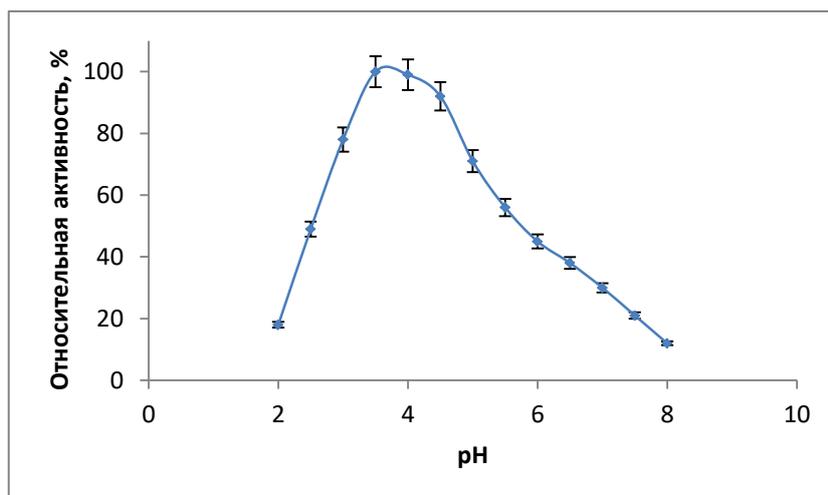
3.3 Свойства новых комплексных ФП, обогащённых XylEстаб, Eg2стаб и PhyАстаб

Мы исследовали свойства (влияние рН и температуры на активность, а также стабильность в растворах и в сухом виде при продолжительном воздействии повышенных температур) ранее не описанных комплексных ФП, полученных на основе новых мутантных штаммов *P. verruculosum*, несущих гены термостабильных ферментов: XylEстаб, Eg2стаб и PhyАстаб. Результаты, собранные в ходе этого исследования, сравнивали (при наличии) с данными, полученными ранее нашими коллегами для комплексных ФП, обогащенных нативными формами ксиланазы, эндоглюканазы и фитазы [83], [84], [85].

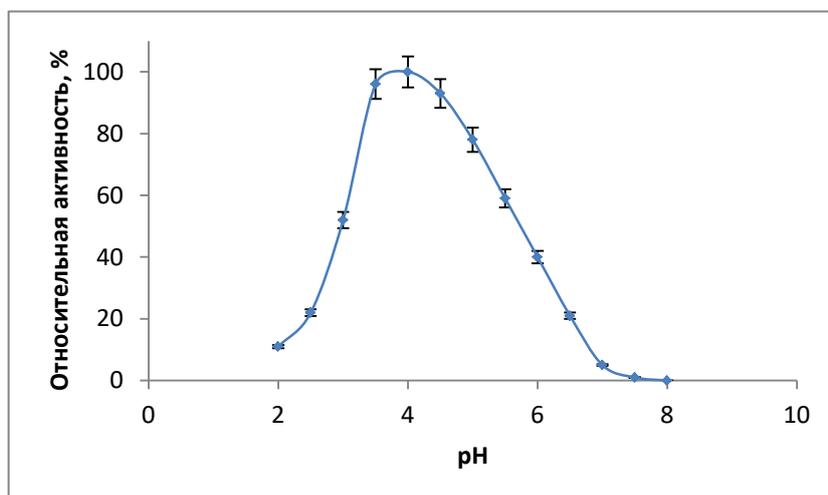
3.3.1 Влияние рН и температуры на активность ФП, содержащих XylEстаб, Eg2стаб и PhyАстаб

рН- и температурные оптимумы действия ФП являются важными характеристиками для их практического применения. Зависимости активности ФП, содержавших XylEстаб, Eg2стаб и PhyАстаб от рН были изучены в диапазоне 2,0-8,0 с шагом 0,5 единиц рН. Полученные рН-профили представлено на рисунке 21.

а)



б)



в)

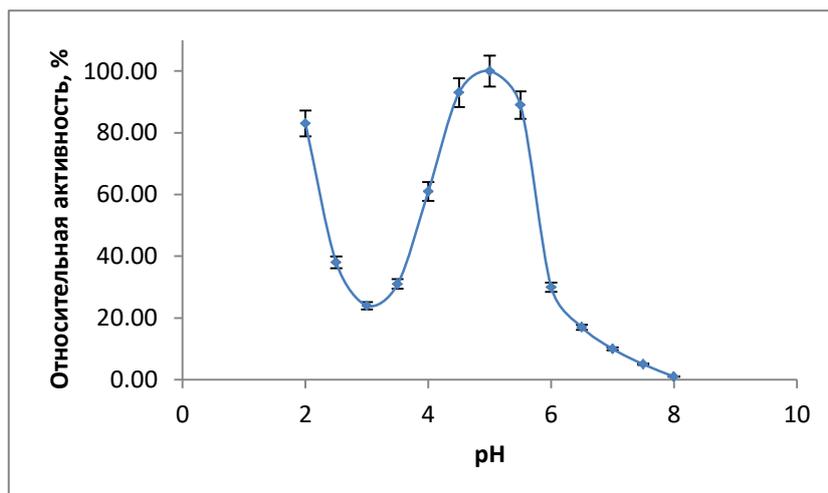


Рисунок 21. Зависимость активности ФП, содержащих ХylЕстаб (а), Eg2стаб (б) и PhyАстаб (в) от pH (50°C).

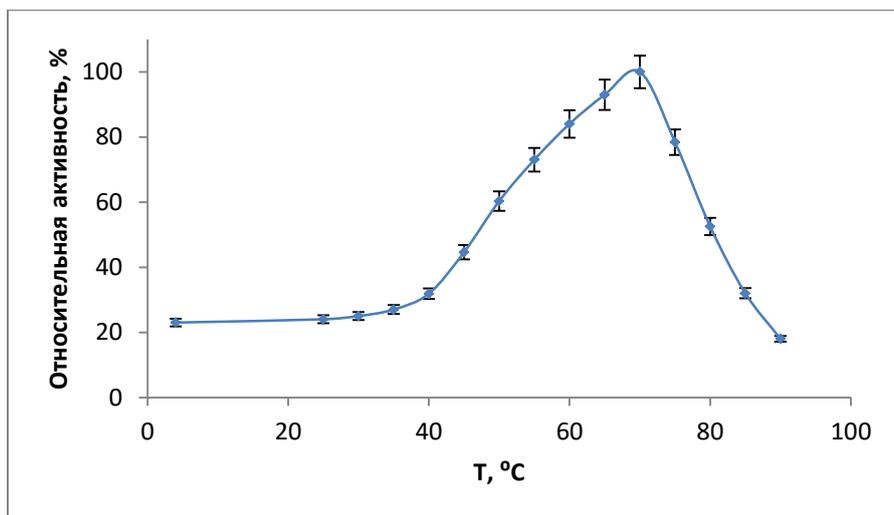
Как видно из рисунка 21а, рН-оптимум ФП, содержащего XylEстаб, находится в районе рН3,5-4,0. Область действия ФП, в котором он сохраняет 50% активности, находится в диапазоне рН2,5-5,5. Максимум активности ФП, содержащего Eg2стаб, составил рН4,0, а диапазон значений рН, при которых сохранял 50% от максимальной активности был чуть уже, чем для ФП, содержащего XylEстаб, и равнялся рН3,0-5,5. Максимум активности ФП, содержащего PhuAстаб, также находился в слабокислой области и составил рН5,0. В отличие от первых двух препаратов, ФП на основе PhuAстаб обладал повышенной (80% от максимально возможной) активностью в сильно кислой области в районе рН 2,0. Диапазон значений рН, при которых ФП PhuAстаб сохранял 50% от максимальной активности, составил рН 2,0-2,3 и рН 4,0-5,5.

рН-оптимумы действия ФП, обогащённых XylEстаб и Eg2стаб совпадали с аналогичными параметрами для ФП на основе XylE и Eg2 [83], [84], [85]. рН-оптимум активности ФП, обогащённого PhuA, был в районе рН4,0, т.е. чуть ниже, чем для ФП на основе PhuAстаб.

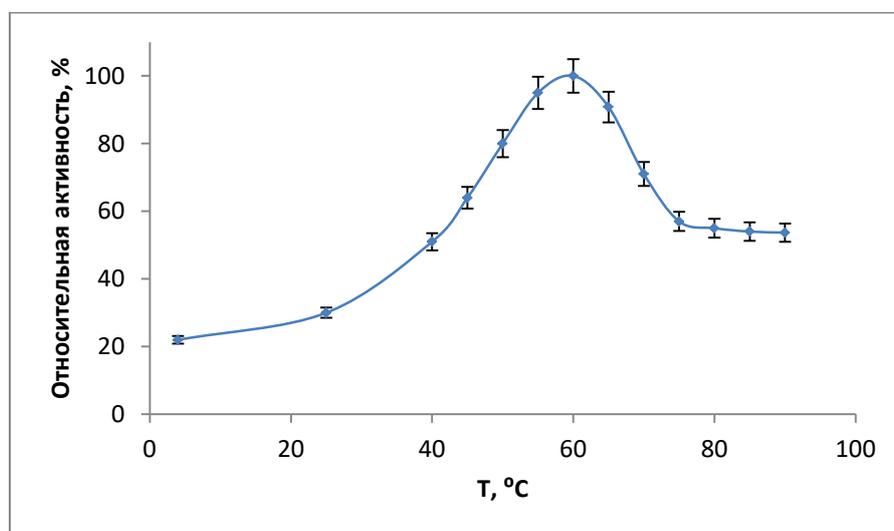
Нами была получена зависимость активности ФП от температуры. Она представлена на рисунке 22.

Согласно собранным данным, ФП, содержащий XylEстаб, сохранял более 50% активности в интервале температур 50-80°C при оптимуме действия в районе 70°C. Температура, при которой ФП, содержащий Eg2стаб, проявлял наибольшую активность, была ниже и составила 60°C. В то же время диапазон температур, при котором он сохранял более 50% от максимальной активности, был шире, чем для ФП с XylEстаб, и составил 40-90°C. Самым низким температурным оптимумом в 55°C характеризовался ФП на основе PhuAстаб. Диапазон температур, при котором в данном препарате сохранялось более 50% от максимальной активности, также был сдвинут в область меньших значений 35-65°C.

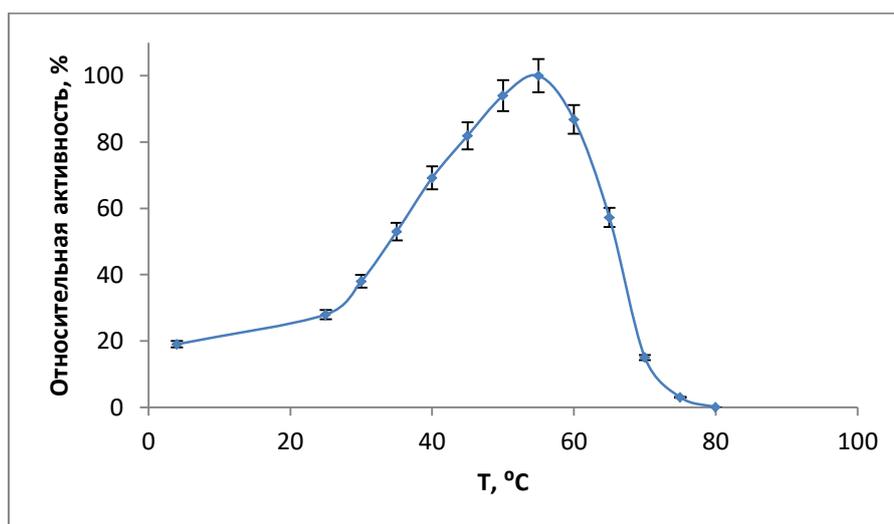
Т-оптимумы действия ФП, обогащённых Eg2стаб и PhuAстаб совпадали с аналогичными параметрами для ФП на основе Eg2 и PhuA. Т-оптимум активности ФП, обогащённого XylEстаб, был на 5°C выше, чем для ФП на основе XylE [83], [84], [85].



a)



б)



в)

Рисунок 22. Зависимость активности ФП, содержащих ХylЕстаб (а), Eg2стаб (б) и PhуАстаб (в) от температуры (рН5,0).

3.3.2 Стабильность ФП, содержащих XylEстаб, Eg2стаб и PhuAстаб, в растворе при длительном воздействии повышенных температур

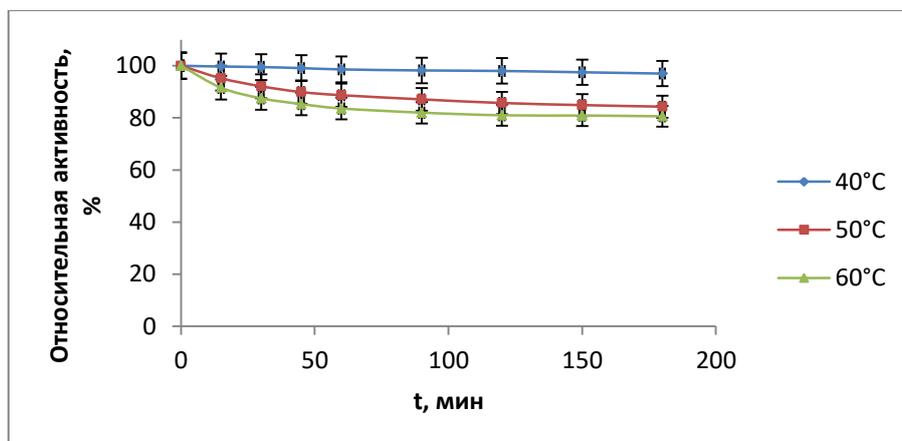
Помимо исследования зависимости активности ФП, содержавших XylEстаб, Eg2стаб и PhuAстаб, от температуры, определенной при кратковременном (10 мин) воздействии этого факторов, нами была изучена их способность сохранять свою активность при продолжительной (до 3 ч) инкубации в различных температурных условиях (40, 50 и 60°C) при pH 5,0.

Как видно из рисунка 23а, растворы ФП на основе XylEстаб сохраняли достаточно высокую активность за 3 часа инкубации: 97, 85 и 81% исходной активности при 40, 50 и 60°C соответственно. Растворы Eg2стаб проявляли чуть большую устойчивость к длительной инкубации при повышенной температуре: при 40 и 50 °C сохранялось 95-97% исходной активности, а при 60°C - около 87% (рисунок 23б). Растворы ФП на основе PhuAстаб при 40 и 50°C вели себя аналогично ксиланазному ФП, сохраняя 94 и 85% исходной активности за 3 часа инкубации (рисунок 23в), соответственно; однако были наименее всего устойчивы при 60°C: через 1,5 часа инкубации происходила полная инактивация, а период полуинактивации составил менее 15 минут.

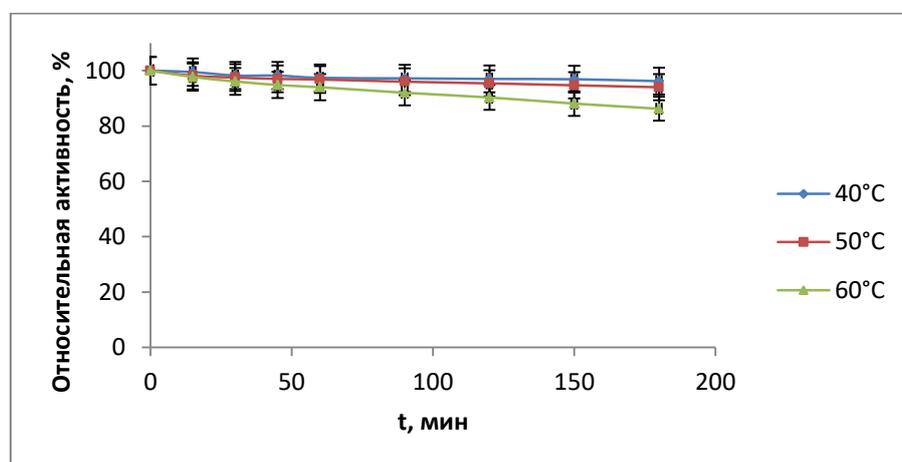
Стабильность ФП, обогащённых Eg2, XylE и PhuA, в аналогичных условиях была в среднем несколько ниже (на 2-15%), чем для ФП, обогащённых стабилизированными формами ферментов [83], [84], [85].

3.3.3 Стабильность ФП, содержащих XylEстаб, Eg2стаб и PhuAстаб, в растворе при кратковременном воздействии высоких температур

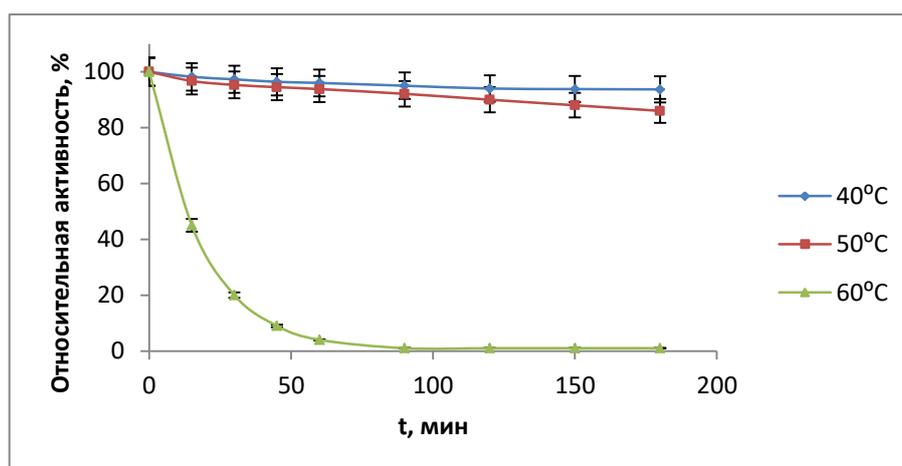
Как уже было отмечено, на этапе гранулирования при производстве кормов ФП, используемые в качестве добавок, подвергаются воздействию высоких температур. Гранулирование происходит за счёт так называемой распылительной сушки, при которой ферменты в струе горячего водяного пара наносятся на полисахаридную матрицу (как правило, крахмал). Несмотря на короткое время воздействия (несколько секунд), активность ферментов после гранулирования снижается. Производственный процесс сложно моделировать в лаборатории (точный подбор температуры и влажности), поэтому для изучения термостабильности ФП были подобраны условия, при которых они подвергаются более жёсткому температурному воздействию (т.н. «термошоку»), чем в предыдущем эксперименте.



а)

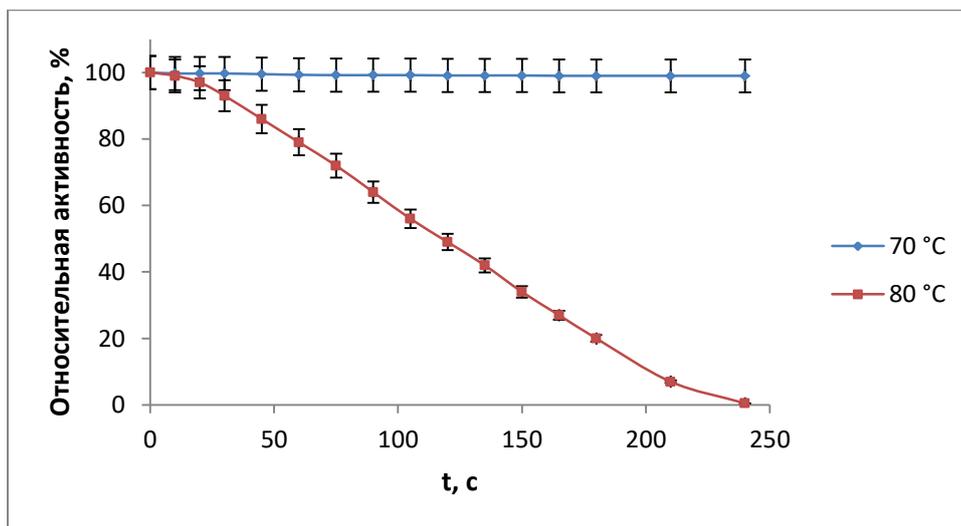


б)

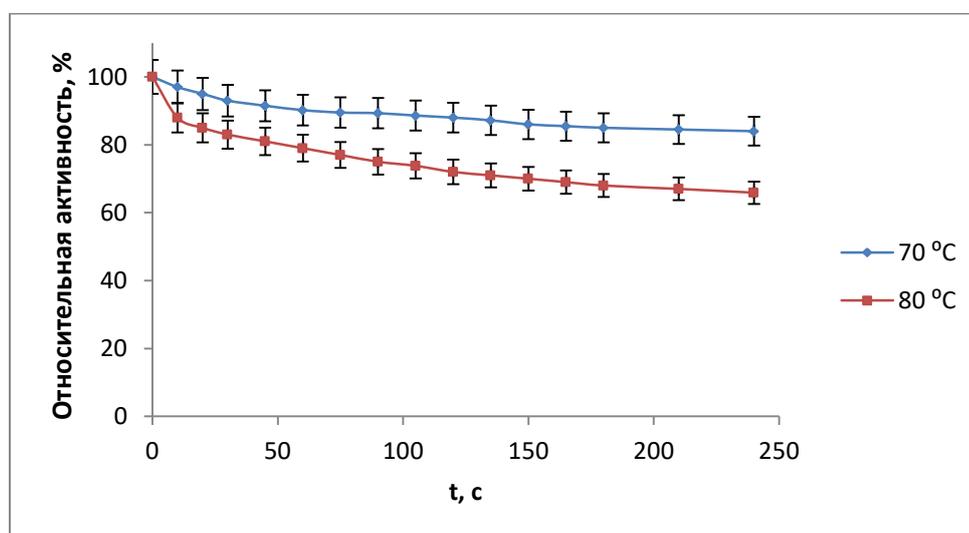


в)

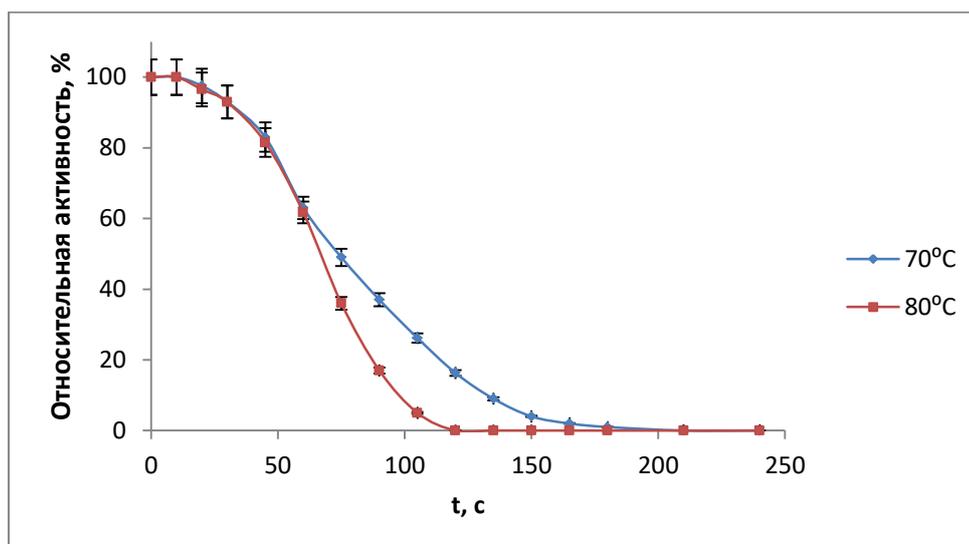
Рисунок 23. Стабильность растворов ХуЕстаб (а), Ег2стаб (б) и РпуАстаб (в) при длительном воздействии повышенных температур (40, 50 и 60°C, рН 5,0).



a)



б)



в)

Рисунок 24. Стабильность ХулЕстаб (а), Eg2стаб (б) и PhuАстаб (в) при 70 и 80°C в растворе (рН5,0).

Мы изучали стабильность ФП, содержавших XylEстаб, Eg2стаб и PhuAстаб, в растворах при 70 и 80°C на протяжении 4 мин. Полученные результаты были представлены в виде зависимостей остаточной активности от времени, где за 100% была принята активность ФП до воздействия высоких температур (рисунок 24).

Как видно из рисунка 24а, при нагревании до 70°C активность ФП на основе XylEстаб за 4 минуты не снижалась вовсе, а при 80°C период полуинактивации составил 120 сек. ФП на основе Eg2стаб был несколько менее стабилен: при 70°C Eg2стаб за 4 мин сохраняет около 85%, а при 80°C - 65% исходной активности (рисунок 24б). Наименее устойчивым в условиях, имитирующих процесс пелитизации кормов, оказался ФП на основе PhuAстаб, период полуинактивации которого при 70 и 80°C составил около 75 сек (рисунок 24в).

Стабильность ФП, обогащённых Eg2, XylE и PhuA, в аналогичных условиях была в целом заметно ниже, чем для ФП, обогащённых стабилизированными формами ферментов [83], [84], [85].

3.3.4 Стабильность ФП, содержащих XylEстаб, Eg2стаб и PhuAстаб, в сухом виде при кратковременном воздействии высоких температур

Ещё одним способом оценить термостабильность ФП в жёстких условиях является его инкубация при высокой температуре (70-100°C) в сухом виде. Мы провели эксперимент, в котором нагревали сухие ФП, содержавшие XylEстаб, Eg2стаб и PhuAстаб, в течение часа при 70, 80, 90 и 100 °C, отбирая пробы через 5, 15, 30 и 60 мин и определяя в них остаточную активность по специфическому субстрату. В результате были получены зависимости остаточной активности ФП от времени, где за 100% была принята активность ФП до воздействия высоких температур.

Как видно из рисунка 25а, ФП на основе XylEстаб в сухом виде за час сохранял до 96% исходной активности при нагревании до 70 и 80 °C и до 78-89% исходной активности при 90 и 100 °C. ФП, обогащённый Eg2стаб, оказался более стабильным: при 70 и 80°C в течение часа он практически не терял исходную активность, а при 90 и 100°C его свойства ухудшились лишь на 7-10% от исходного значения (см. рисунок 25б). Наиболее чувствительным к воздействию высоких температур в сухом виде (аналогично эксперименту с растворами, см. предыдущий раздел) оказался ФП на основе PhuAстаб: он сохранял порядка 96, 92, 87 и 81 % исходной активности за час инкубации при 70, 80, 90 и 100°C, соответственно.

Для ФП, обогащённых Eg2, Ху1Е и РһуА, аналогичных результатов не представлено [83], [84], [85].

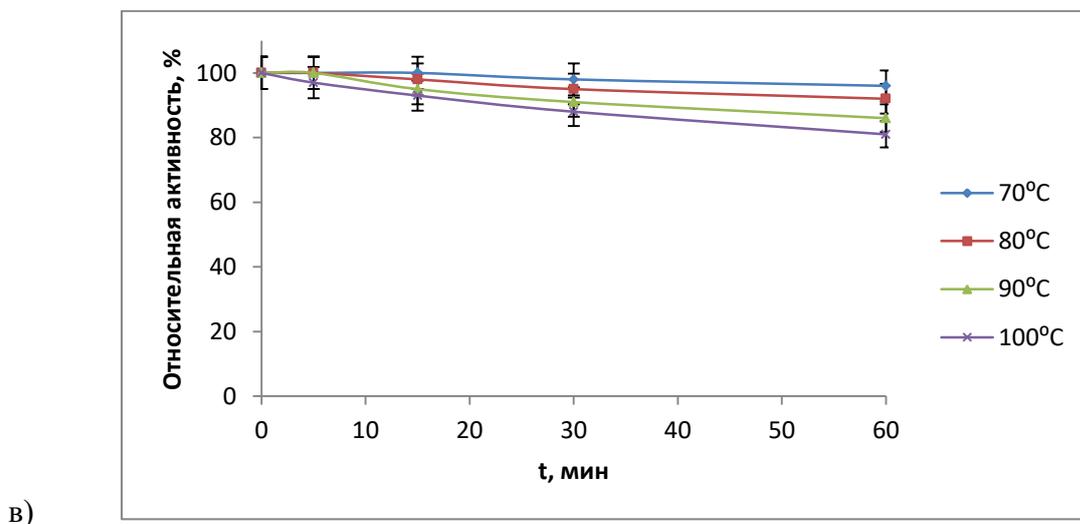
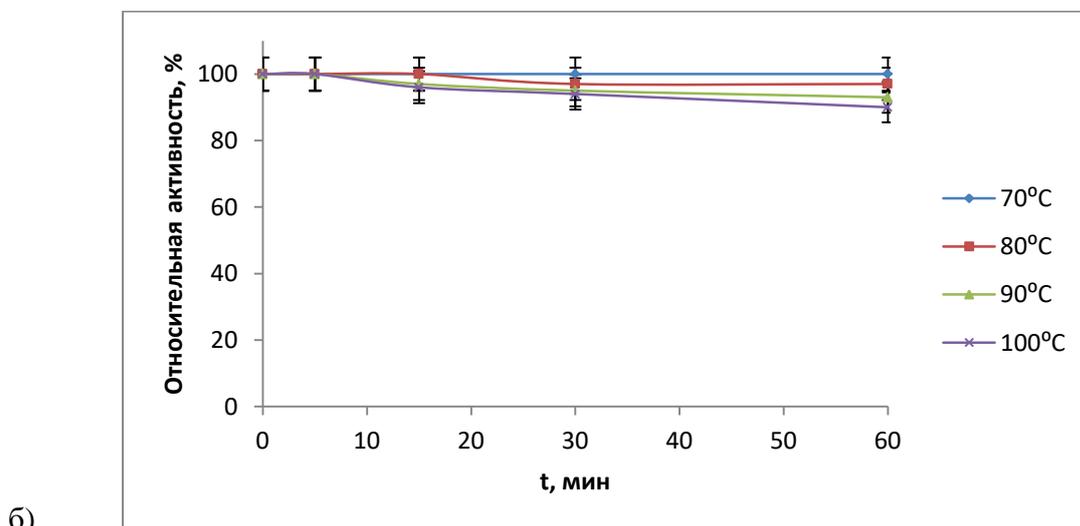
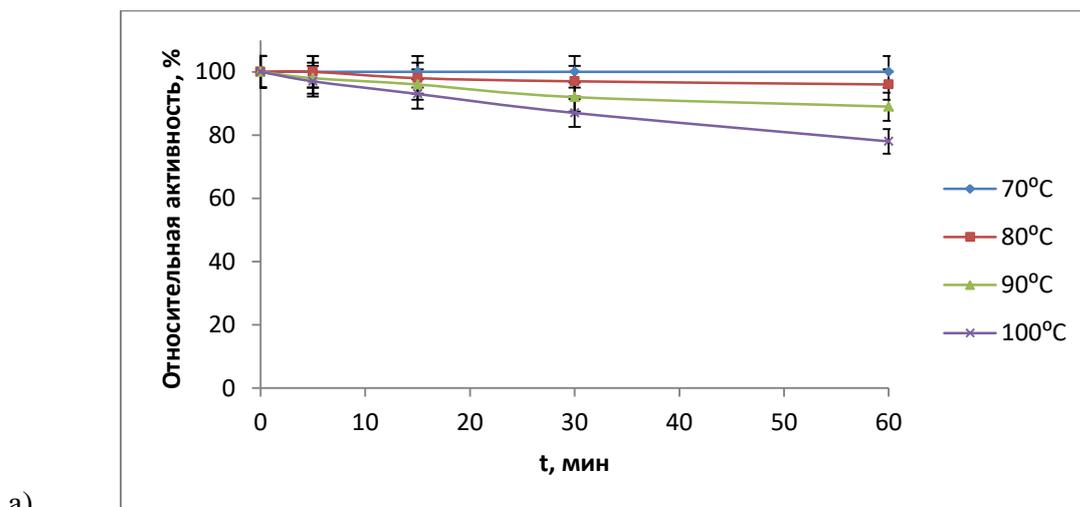


Рисунок 25. Стабильность Ху1Естаб (а), Eg2стаб (б) и РһуАстаб (в) при 70, 80, 90 и 100 °С в сухом виде.

3.4 Сравнительное исследование ХуIE и ХуIEстаб

3.4.1 Выделение и очистка ХуIE и ХуIEстаб

ХуIE и ХуIEстаб выделяли из препаратов #3147 и #3.693.4 соответственно.

Для выделения ферментов нами была выбрана методика, включающая в себя несколько стадий хроматографического фракционирования.

На предварительной стадии подготовки ФП к хроматографическому разделению необходимо было отделить белковую часть ФП от примесей (пигментов, полисахаридных носителей и пр.). Для этого к раствору ФП добавляли сульфат аммония в (80% от насыщения) и перемешивали до растворения соли. Сформировавшийся в течение суток при 4°C осадок белка отделяли от надосадочной жидкости и перерастворяли в Na-ацетатном буфере, pH 5,0.

Для обессоливания получившегося раствора была проведена ГПХ низкого давления. Полученный раствор белка далее фракционировали с помощью анионообменной хроматографии на колонке Source 15Q (объём 30 мл) в 20 mM bis-Tris/HCl, pH 6,8, в линейном градиенте 1M NaCl (от 0 до 40%, рисунок 29).

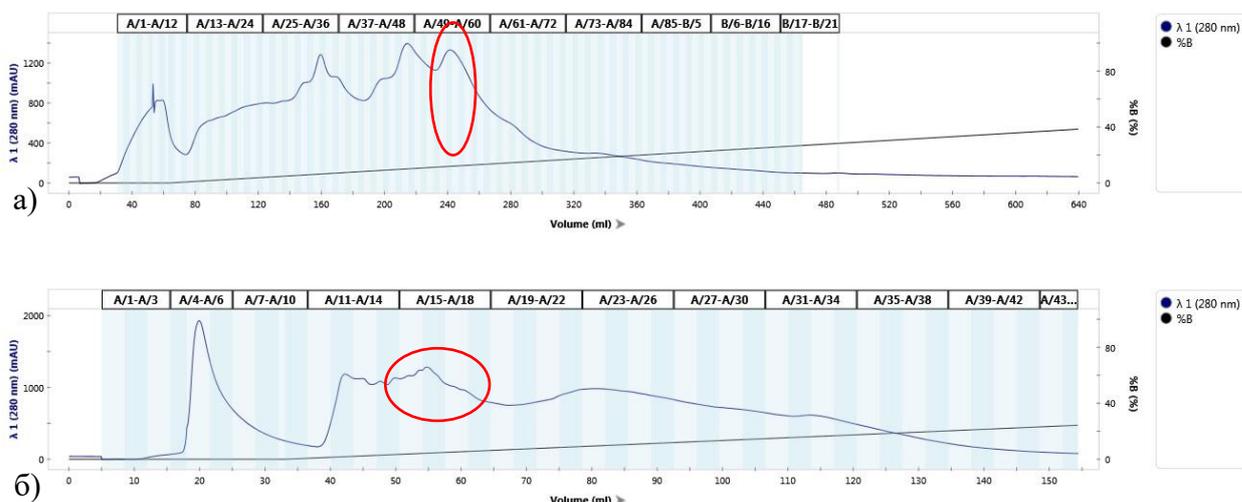


Рисунок 29. а) Хроматограмма, полученная после разделения ФП #3147, содержащего ХуIE, на колонке с анионообменным носителем; б) хроматограмма, полученная после разделения ФП #3.693.4, содержащего ХуIEстаб, на колонке с анионообменным носителем.

В полученных после анионообменной хроматографии фракциях была определена активность по ксилану, а также были проведены ДДС-ЭФ в ПААГ. По результатам этих анализов фракции А52-А62 (см. хроматограмму для ФП #3147, содержащего ХуIE) и

фракции А14-А19 (см. хроматограмму для ФП #3.693.4, содержащего XylEстаб), выходящие в середине градиента соли, были объединены. Именно эти фракции проявляли наибольшую активность по ксилану и содержали максимальное количество белка с массой порядка 40 кДа. ДДС-ЭФ полученных объединённых фракций (ОФ) приведены на рисунке 30. Полученные ОФ, обогащённые искомыми ферментами, подвергли дальнейшему разделению на колонке с гидрофобным носителем.

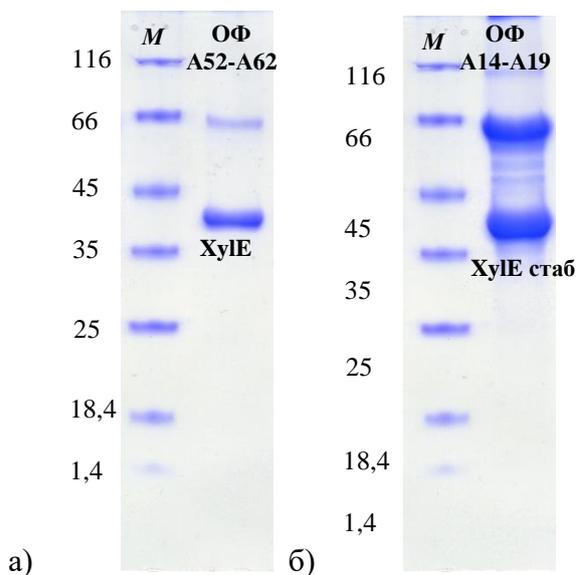


Рисунок 30. а) ДДС-ЭФ ОФ А52-А62, полученной после анионообменной хроматографии ФП #3147, содержащего XylE; б) ДДС-ЭФ ОФ А14-А19, полученной после анионообменной хроматографии ФП #3.693.4, содержащего XylEстаб.

Предварительно к ОФ был добавлен сульфат аммония до концентрации 1,7М. Для разделения использовали колонку с гидрофобным носителем Source15Iso объёмом 10мл. Разделение проводили в 50 мМ Na-ацетатном буфере, рН5,0, в линейном градиенте 1,7М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ от (100 до 0% за 20 объёмов колонки). Полученные хроматограммы представлены на рисунке 31.

В собранных в ходе гидрофобной хроматографии фракциях была измерена активность по ксилану и проведены ДДС-ЭФ в ПААГ. Выяснилось, что XylE содержится во фракциях А1-А9, а XylEстаб - во фракциях А1-А6 (см. рис. 31а и б). Соответствующие фракции были объединены. Согласно ДДС-ЭФ в них содержались гомогенные XylE и XylEстаб (см. рисунок 32). В полученных ОФ были определены активность по ксилану и общее содержание белка (по поглощению на длине волны 280 нм, A_{280}), данные приведены в таблице 13.

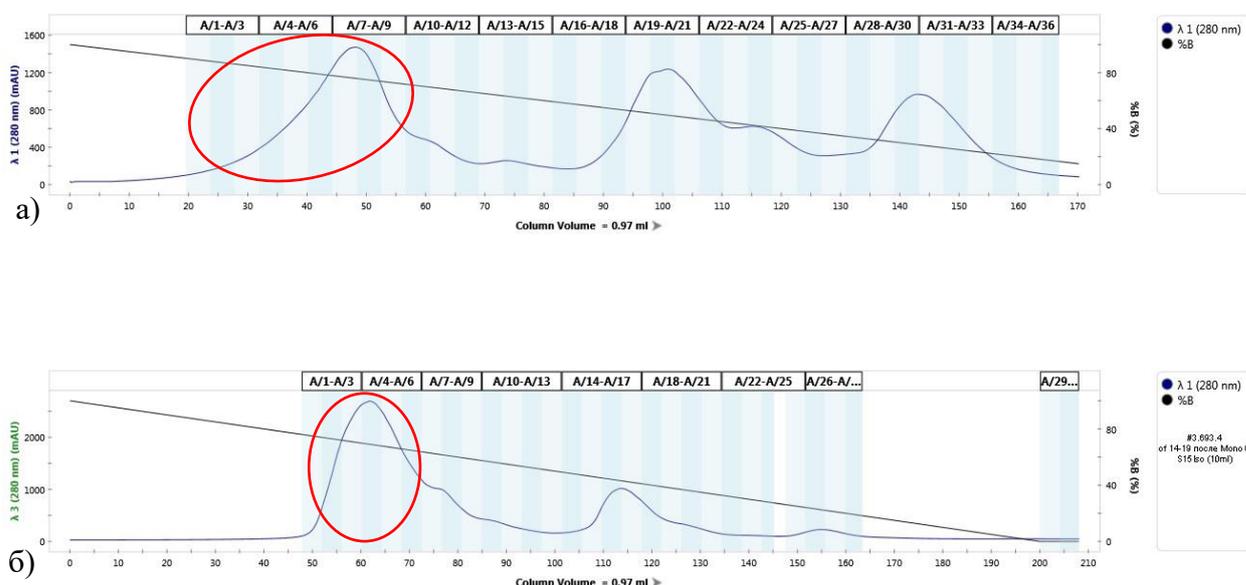


Рисунок 31. Хроматограммы, полученные после гидрофобного разделения ОФ А52-А62, полученной после анионообменной хроматографии ФП #3147, содержащего ХуIE (а) и ОФ А14-А19, полученной после анионообменной хроматографии ФП #3.693.4, содержащего ХуIEстаб (б).

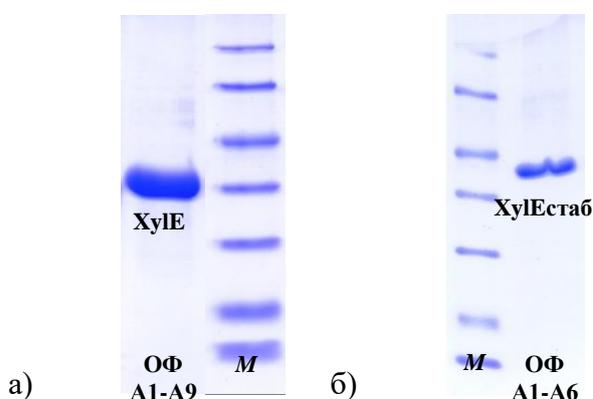


Рисунок 32. а) ДДС-ЭФ ОФ А1-А9, полученной после гидрофобной хроматографии ОФ А52-А62, содержащей ХуIE; б) ДДС-ЭФ ОФ А1-А6, полученной после гидрофобной хроматографии ОФ А14-А19, содержащей ХуIEстаб.

Таблица 13. Содержание белка и активность по ксилану в ОФ, полученных после гидрофобной хроматографии фракций, обогащённых ХуIE и ХуIEстаб.

№ ОФ	Фермент	Объём фракции, мл	Концентрация белка, мг/мл	Общий выход белка, мг	Активность по ксилану, ед/мл
А1-А9	ХуIE	340	0,33 ± 0,02	112 ± 6	25,4 ± 2,4
А1-А6	ХуIEстаб	255	0,42 ± 0,02	107 ± 5	31,7 ± 2,6

Часть ОФ (порядка 2/3 от общего объёма), содержащей XylE и XylEстаб подвергли ГПХ на колонке с носителем Bio-Gel P-4 (1 x 50 см, объем 50 мл) для обессоливания и замены буфера на 50 мМ NH₄Ac, рН5,5, после чего провели лиофильную сушку выделенных белков. В результате было получено примерно по 60 мг XylE и XylEстаб в лиофилизированном виде, активность которых приведена в таблице 14. Отметим, что удельные активность обоих ферментов совпадали в пределах ошибки.

Таблица 14. Активность высушенных образцов XylE и XylEстаб, определённая по ксилану.

Фермент	Общий выход белка, мг	Активность по ксилану, ед/мг белка
XylE	61 ± 3	77 ± 5
XylEстаб	65 ± 3	70 ± 4

Итак, в итоге проведённой очистки и разделения комплексных ФП #3147, содержащего XylE, и ФП #3.693.4, содержащего XylEстаб, нами было получено примерно по 100 мг гомогенных XylE и XylEстаб в активной форме как в виде раствора, так и в сухом виде, пригодных для дальнейших исследований.

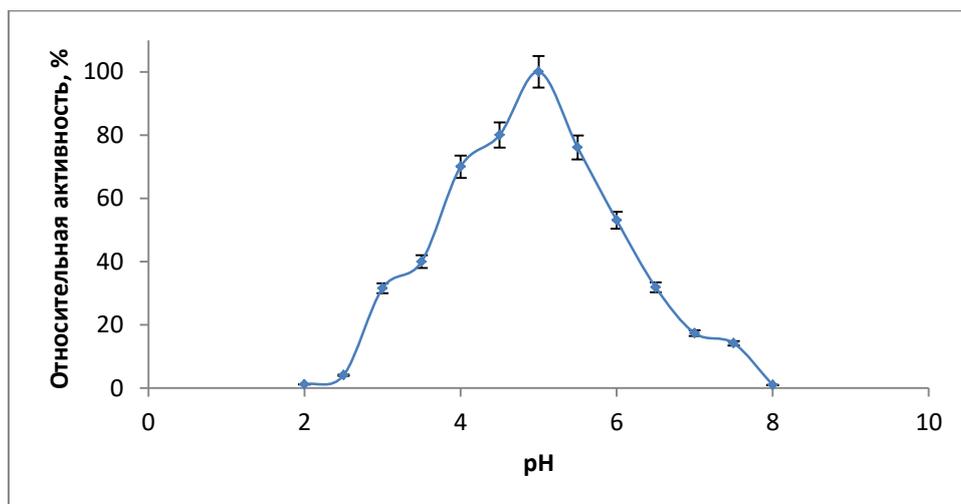
3.4.2 Влияние рН и температуры на активность XylE и XylEстаб

Важными характеристиками гомогенных ферментов, как и комплексных ФП, являются рН- и температурные оптимумы их действия. Нами были получены зависимости активности нативной и стабилизированной XylE *P. canescens* от рН в диапазоне 2,0-8,0 с шагом 0,5 единиц рН. Полученные рН-профили представлены на рисунке 24.

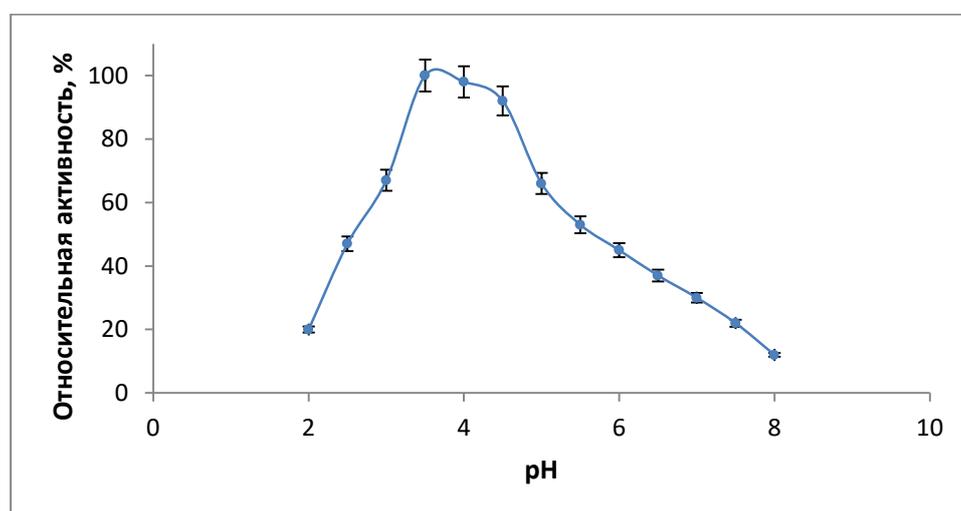
Как видно из рисунка, профили зависимости активности нативной и стабилизированной XylE от рН не совпадают. Максимум активности обеих форм находится в слабокислой области рН и составляет 5,0 для XylE и 4,0 для XylEстаб. Диапазон значений рН, при которых XylE и XylEстаб сохраняют 50% от максимальной активности, составляет рН4,0-6,0 XylE рН2,0-6,0 для XylEстаб.

Также нами была получена зависимость активности нативной и стабилизированной XylE от температуры. Полученные профили представлены на рисунке 25. Как видно из рисунка, температура, при которой исследуемые ферменты проявляли наибольшую активность, составила 65°С для XylE и 70°С для XylEстаб. Диапазон температур, при котором XylE

сохраняли 50% от максимальной активности, составил 50-75°C для XylE и 47-80°C для XylEстаб.

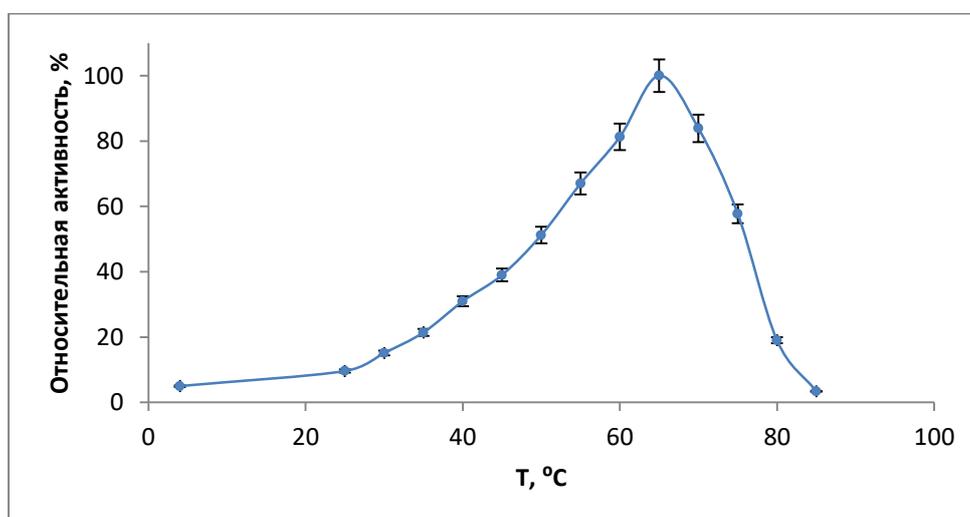


a)

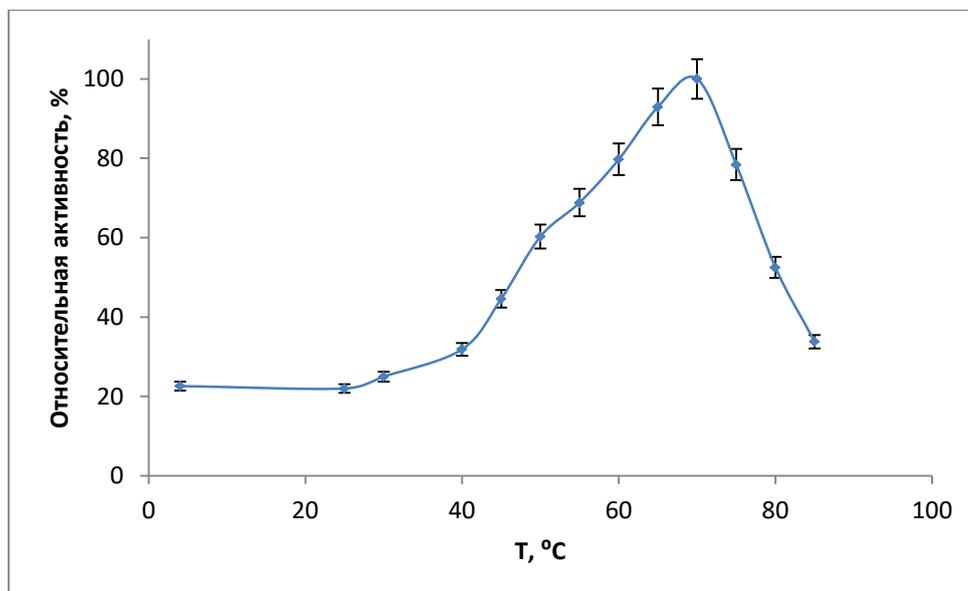


б)

Рисунок 24. Зависимость активности XylE (а) и XylEстаб (б) от pH (50°C).



a)

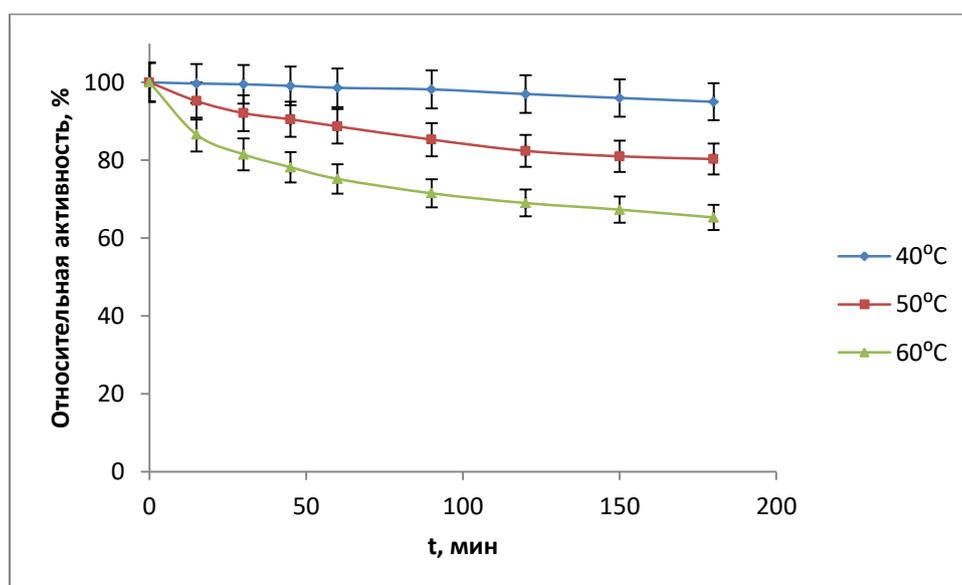


б)

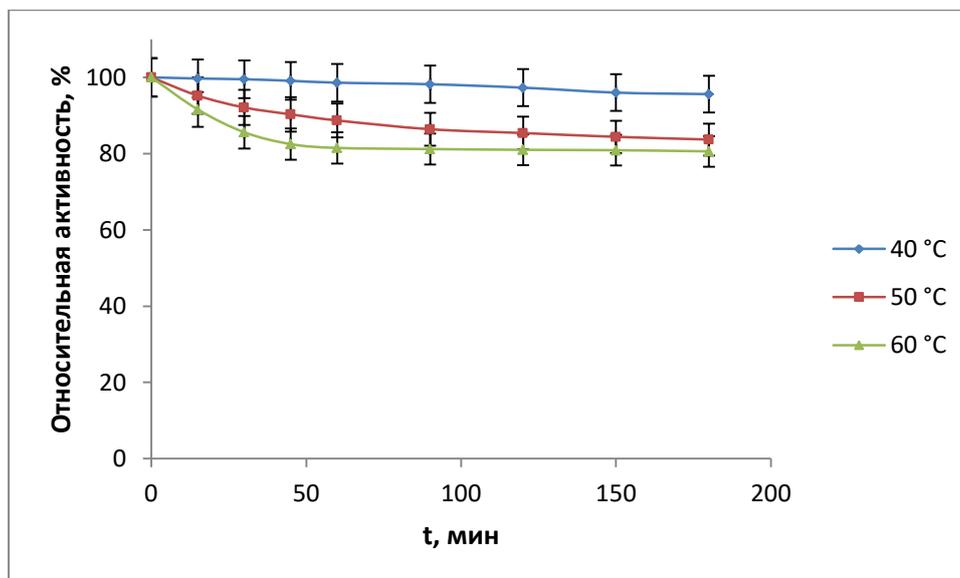
Рисунок 25. Зависимость активности XylE (а) и XylEстаб (б) от температуры (pH5,0).

3.4.3 Стабильность XylE и XylEстаб в растворе при длительном воздействии повышенных температур

Помимо исследования зависимости активности XylE и XylEстаб от температуры, определенной при кратковременном (10 мин) воздействии этого факторов, нами была изучена способность ферментов сохранять свою активность при продолжительной (до 3 ч) инкубации в различных температурных условиях (40, 50 и 60°C) при pH 5,0.



а)



б)

Рисунок 26. Стабильность растворов XylE (а) и XylEстаб (б) при длительном воздействии повышенных температур (рН 5,0).

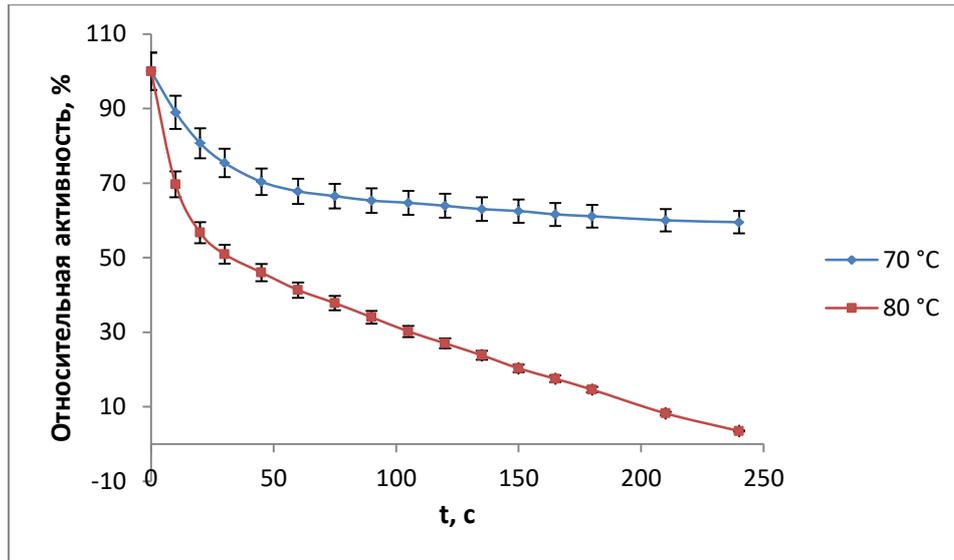
Как видно из рисунка 26, растворы обеих форм сохраняли достаточно высокую активность при продолжительном действии 40 и 50°C (через 3 ч инкубации при 40°C сохранялось 95% исходной активности; при 50°C – 80% исходной активности). Однако при 60°C активность XylE за 3 часа снижалась на 35%, в то время как активность XylEстаб снижалась только на 20%.

3.4.4 Стабильность XylE и XylE стаб в растворе при кратковременном воздействии высоких температур

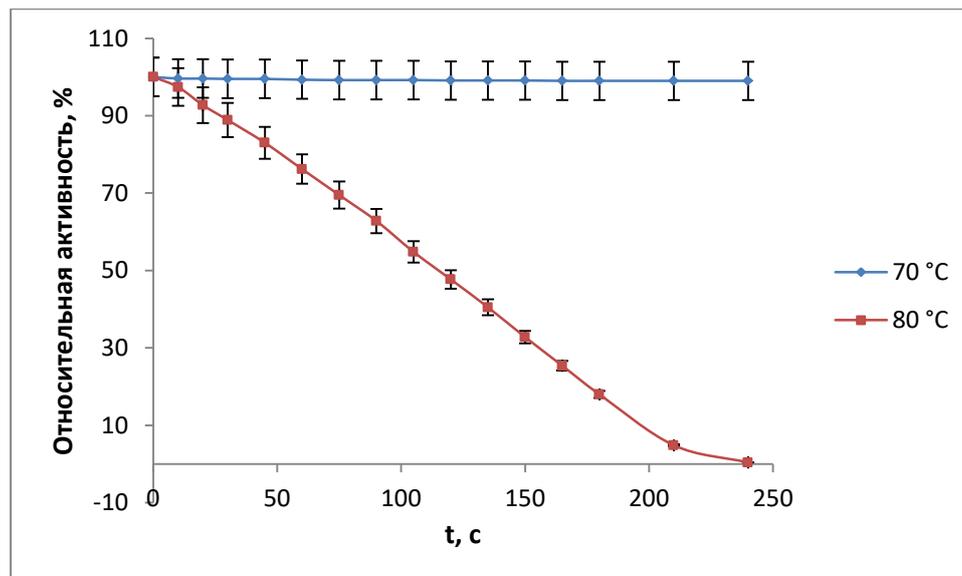
Мы изучили стабильность обоих ферментов в растворе при 70 и 80°C на протяжении 4 минут, отбирая пробы каждые 15 сек в течение первой минуты и каждые 30 сек далее, и определяя остаточную активность. Полученные результаты были представлены в виде зависимостей остаточной активности от времени, где за 100% была принята активность препарата до воздействия высоких температур. На рисунке 26а представлена такая зависимость для XylE.

Как мы видим, при нагревании до 70°C активность XylE за 4 минуты снижалась на 40%. При 80°C в растворе за 4 минуты происходит практически полная инактивация, и время полуинактивации составило 30 секунд.

Аналогичные данные были получены для XylEстаб, зависимость представлена на рисунке 26б.



a)



б)

Рисунок 26. Стабильность XylE (a) и XylEстаб (б) при 70 и 80°C в растворе (pH5,0).

По сравнению с нативной формой, термостабильная ксиланаза дольше сохраняла активность в растворе. При 70°C активность за 4 минуты не снижалась вовсе, а при 80°C период полуинактивации составил 110 секунд, что примерно в 3,5 раза больше, чем для нативной формы фермента.

3.4.5 Стабильность Ху1Е и Ху1Естаб в сухом виде при кратковременном воздействии высоких температур

Мы провели сравнительное изучение стабильности Ху1Е и Ху1Естаб при 70, 80, 90 и 100°C на протяжении 1 ч, отбирая пробы сухого фермента через 5, 15, 30 и 60 мин. Полученные результаты были представлены в виде зависимостей остаточной активности от времени, где за 100% была принята активность фермента до воздействия высоких температур, см. рисунок 27.

Как видно из представленных данных, обе формы фермента в сухом виде сохраняют до 90% активности при нагревании до 70 и 80°C в течение часа, однако при 90 и 100°C активность Ху1Естаб за час снижается не более, чем на 20% от исходной, в то время как нативный фермент при этих температурах сохранял лишь 40-50% активности.

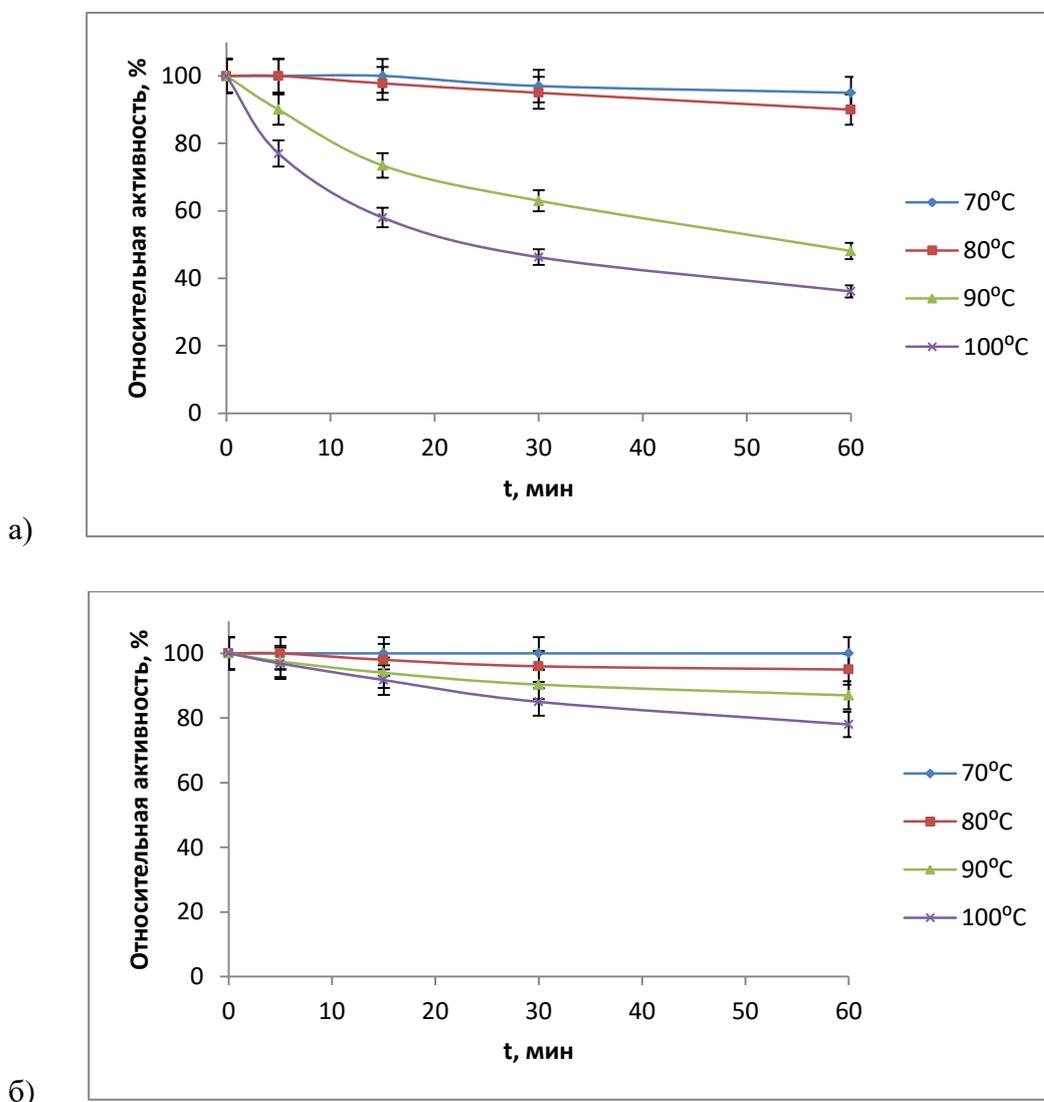


Рисунок 27. Стабильность Ху1Е (а) и Ху1Естаб (б) при 70, 80, 90 и 100 °C в сухом виде.

3.5 Сравнительное исследование Eg2 и Eg2стаб

3.5.1 Выделение и очистка Eg2 и Eg2стаб

Eg2 и Eg2стаб выделяли из препаратов #3147 и #3.640.6 соответственно.

Для выделения Eg2 и Eg2 стаб, нами была выбрана методика, аналогичная очистке ксиланаз (см. предыдущую главу).

После предварительной стадии очистки и подготовки ФП (см. раздел 3.4.1) с помощью осаждения сульфатом аммония и последующего ГПХ низкого давления, раствор белка фракционировали с помощью анионообменной хроматографии на колонке Source 15Q (объём 30 мл) в 20 мМ bis-Tris/HCl, pH6,8, в линейном градиенте 1М NaCl (рисунок 29).

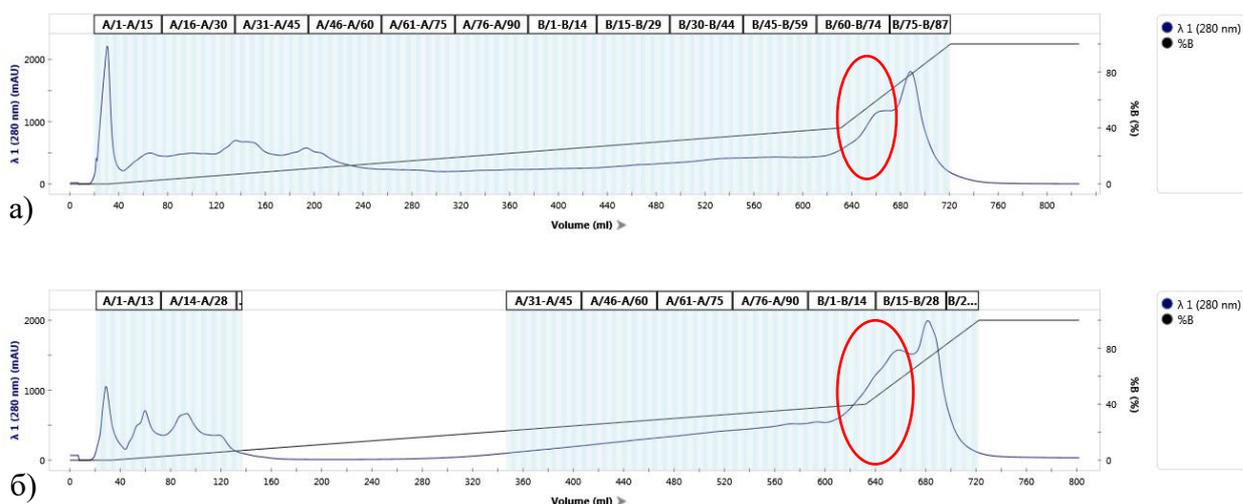


Рисунок 29. а) Хроматограмма, полученная после разделения ФП #3147, содержащего Eg2, на колонке с анионообменным носителем; б) хроматограмма, полученная после разделения ФП #3.640.6, содержащего Eg2стаб, на колонке с анионообменным носителем.

В полученных после анионообменной хроматографии фракциях была определена активность по КМЦ, а также были проведены ДДС-ЭФ в ПААГ. По результатам этих анализов фракции В69-В75 (см. хроматограмму для ФП #3147, содержащего Eg2) и фракции В5-В21 (см. хроматограмму для ФП #3.640.6, содержащего Eg2стаб), выходящие в середине градиента соли, были объединены. Эти фракции содержали максимальное количество белка с массой порядка 37 кДа и обладали наибольшей активностью по КМЦ. ДДС-ЭФ полученных ОФ приведены на рисунке 30. ОФ, обогащённые искомыми ферментами, подвергли дальнейшему разделению на колонке с гидрофобным носителем.

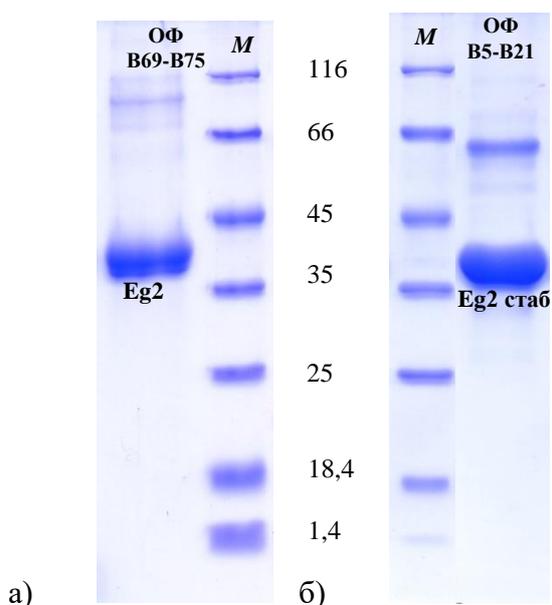


Рисунок 30. а) ДДС-ЭФ ОФ В69-В75, полученной после анионообменной хроматографии ФП #3147, содержащего Eg2; б) ДДС-ЭФ ОФ В5-В21, полученной после анионообменной хроматографии ФП #3.640.6, содержащего Eg2стаб.

Предварительно к ОФ был добавлен сульфат аммония до концентрации 1,7 М. Для разделения использовали колонку с гидрофобным носителем Source15Iso объемом 10мл. Разделение проводили в 50 мМ Na-ацетатном буфере, рН 5,0, в линейном градиенте 1,7 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ от (100 до 0% за 20 объемов колонки). Полученные хроматограммы представлены на рисунке 31.

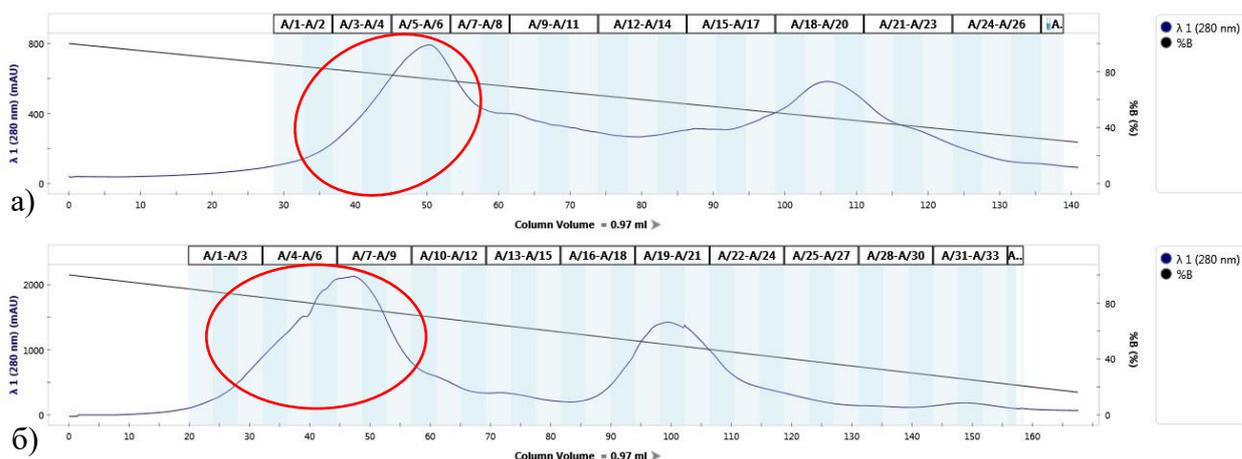


Рисунок 31. а) Хроматограмма, полученная после гидрофобного разделения ОФ В69-В75, полученной после анионообменной хроматографии ФП #3147, содержащего Eg2; б) хроматограмма, полученная после гидрофобного разделения ОФ В5-В21, полученной после анионообменной хроматографии ФП #3.640.6, содержащего Eg2стаб.

Для полученных в ходе гидрофобной хроматографии фракций были проведены ДДС-ЭФ в ПААГ и определены активности по КМЦ, а также общее содержание белка (по поглощению на длине волны 280 нм, A_{280}). Согласно ДДС-ЭФ, полученные фракции содержат гомогенные Eg2 и Eg2стаб (см. рисунок 32). Общий выход гомогенных Eg2 и Eg2стаб составил порядка 100 и 180 мг, соответственно (см. таблицу 13).

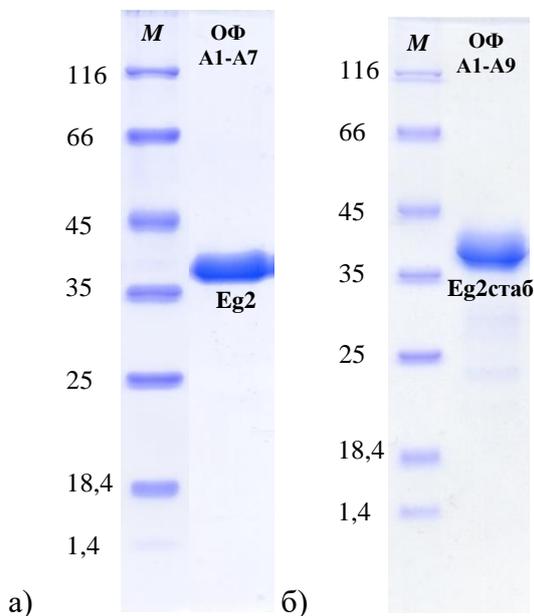


Рисунок 32. а) ДДС-ЭФ ОФ А1-А7, полученной после гидрофобной хроматографии ОФ В69-В75, содержащей Eg2; б) ДДС-ЭФ ОФ А1-А9, полученной после гидрофобной хроматографии ОФ В5-В21, содержащей Eg2стаб.

Таблица 13. Содержание белка и активность по КМЦ в ОФ, полученных после гидрофобной хроматографии фракций, обогащённых Eg2 и Eg2стаб

№ ОФ	Фермент	Объём фракции, мл	Концентрация белка, мг/мл	Общий выход белка, мг	Активность по КМЦ, ед/мл
А1-А7	Eg2	120	$0,82 \pm 0,04$	99 ± 5	50 ± 3
А1-А9	Eg2стаб	244	$0,73 \pm 0,04$	179 ± 9	55 ± 3

Часть ОФ, содержащих Eg2 и Eg2стаб подвергли ГПХ на колонке с носителем Bio-Gel P-4 (1 x 50 см, объём 50 мл) для обессоливания и замены буфера на 50 мМ NH_4Ac , рН5,5, после чего провели лиофильную сушку выделенных ферментов. В результате было получено по 60-70 мг Eg2 и Eg2стаб в лиофилизированном виде, активность которых приведена в таблице 14. Отметим, что удельная активность Eg2стаб, определённая по КМЦ, была примерно на 30% выше, чем удельная активность Eg2.

Таблица 14. Активность высушенных образцов Eg2 и Eg2стаб, определённая по КМЦ

Фермент	Общий выход белка, мг	Активность по КМЦ, ед/мг белка
Eg2	63 ± 3	58 ± 3
Eg2стаб	72 ± 4	69 ± 4

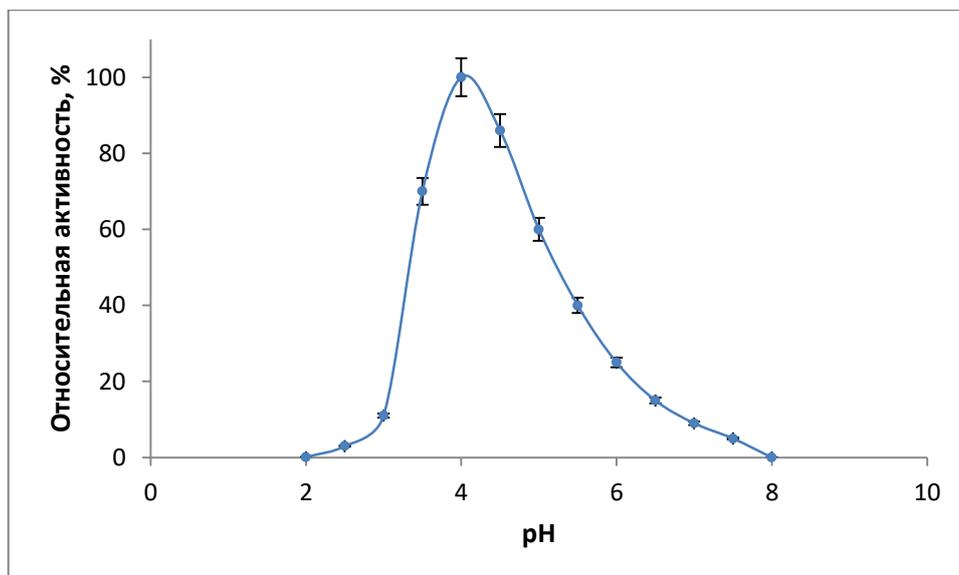
Итак, в итоге проведённой очистки и разделения комплексных ФП #3147 и #3.640.6, нами было получено примерно 100 и 180 мг гомогенных Eg2 и Eg2стаб в активной форме (как в растворённом, так и в сухом виде), пригодных для дальнейших исследований.

3.5.2 Влияние pH и температуры на активность Eg2 и Eg2стаб

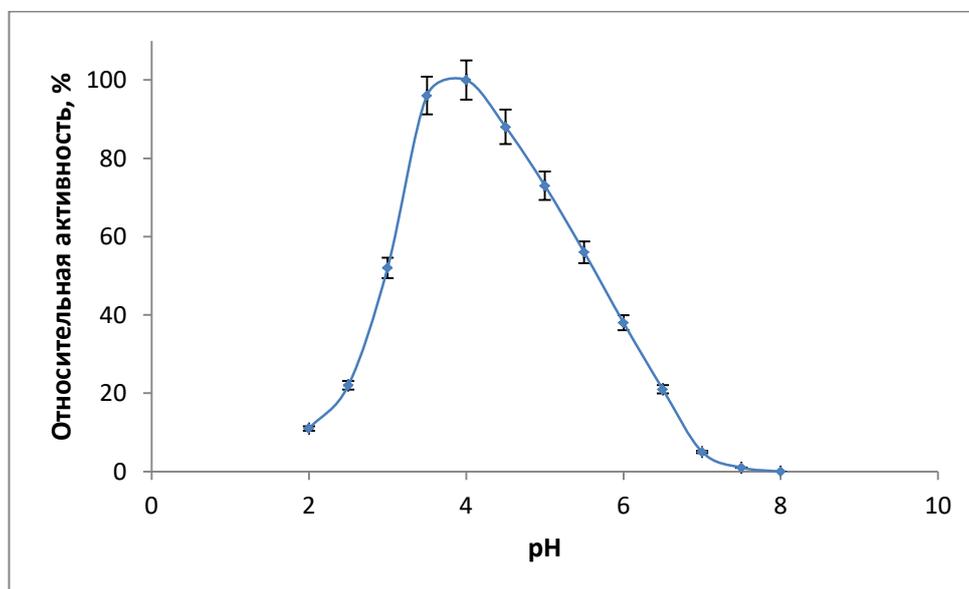
Нами была получены зависимости активности нативной и стабилизированной Eg2 *P. verruculosum* от pH в диапазоне 2,0-8,0 с шагом 0,5 единиц pH. Полученные pH-профили представлены на рисунке 24.

Как видно из рисунка, профили зависимости активности нативной и стабилизированной Eg2 от pH практически совпадают. Максимум активности обоих ферментов лежал в слабокислой области и составил pH4,0. Стабилизированная форма Eg2 отличается от нативной более высокой активностью в диапазоне pH2,0-3,0. Диапазон значений pH, при которых Eg2 и Eg2стаб сохраняли 50% от максимальной активности, составил pH4,0-5,0 и pH3,0-5,0, соответственно.

Также нами была получена зависимость активности нативной и стабилизированной Eg2 от температуры. Полученные температурные профили представлены на рисунке 25. Как видно из рисунка, температура, при которой исследуемые ферменты проявляли наибольшую активность, составила 60°C. Диапазон температур, при котором сохранялось более 50% от максимальной активности, составил 45-70°C для Eg2 и 40-85°C для Eg2стаб.



а)



б)

Рисунок 24. Зависимость активности Eg2 (а) и Eg2стаб (б) от pH (50°C).

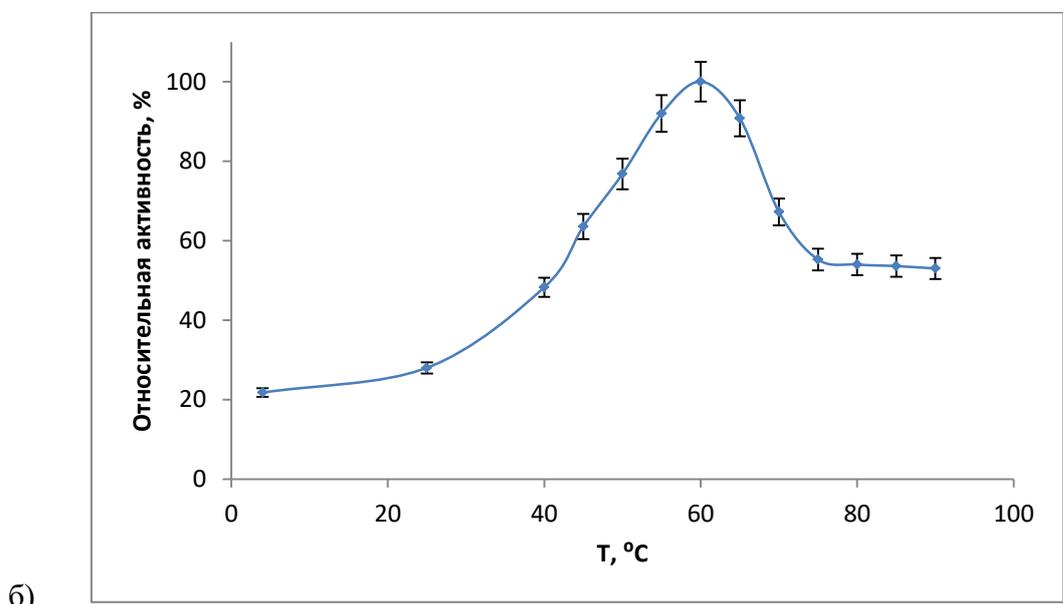
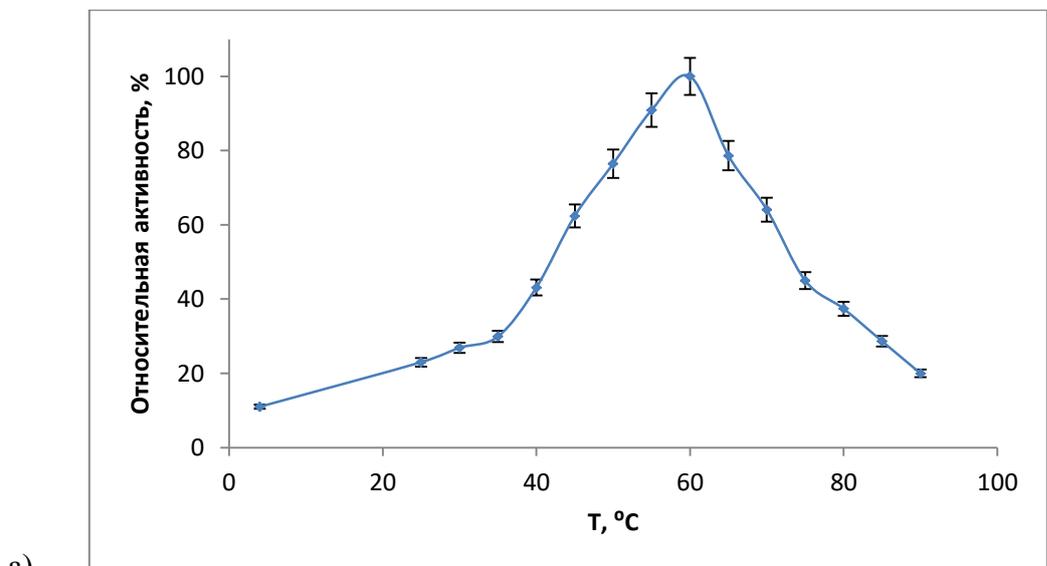


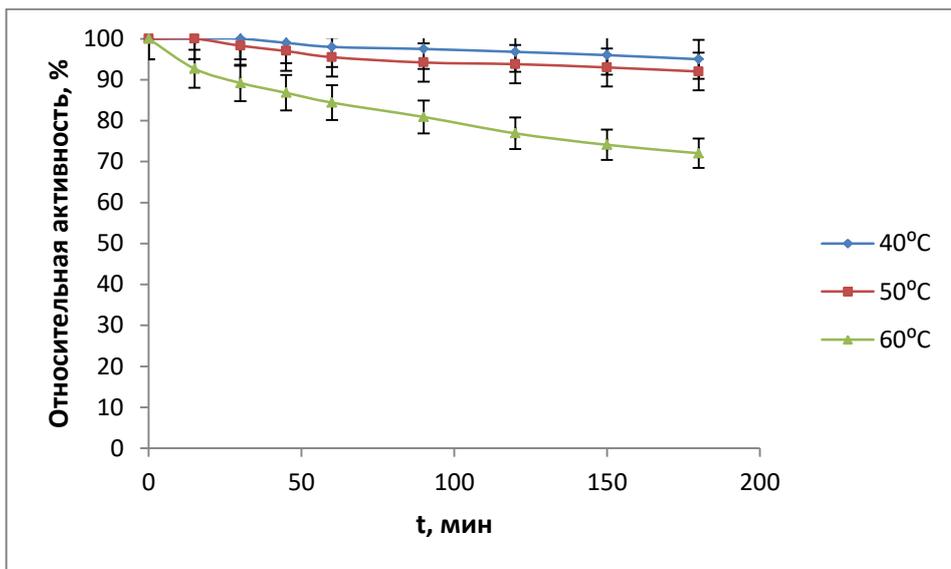
Рисунок 25. Зависимость активности Eg2 (а) и Eg2стаб (б) от температуры (рН5,0).

3.5.3 Стабильность Eg2 и Eg2стаб в растворе при длительном воздействии повышенных температур

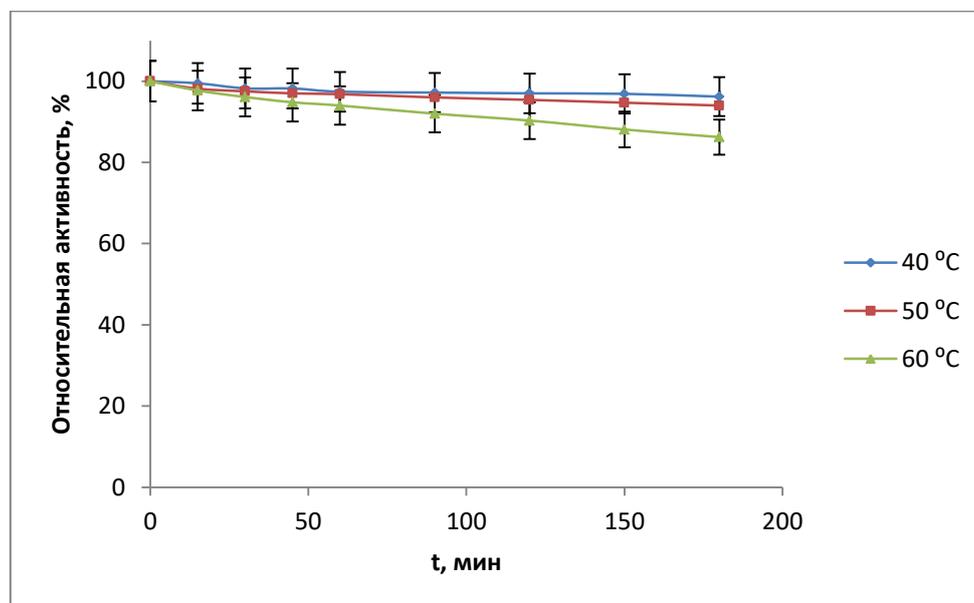
Помимо исследования зависимости активности Eg2 и Eg2стаб от температуры, определенной при кратковременном (10 мин) воздействии этого фактора, нами была изучена способность ферментов сохранять свою активность при продолжительной (до 3 ч) инкубации в различных температурных условиях (40, 50 и 60°C) при рН5,0.

Как видно из рисунка 26 (а), растворы Eg2 проявляли сравнительно высокую устойчивость к продолжительному воздействию повышенных температур: так через 3 ч инкубации при 40 и 50°C она сохраняла около 90% исходной активности, а при 60°C лишь около 70%.

Растворы Eg2стаб проявляли большую устойчивость к длительной инкубации при повышенной температуре: при 40 и 50 °C сохранялось около 95% исходной активности, а при 60°C - около 85% (рисунок 26 (б)).



а)



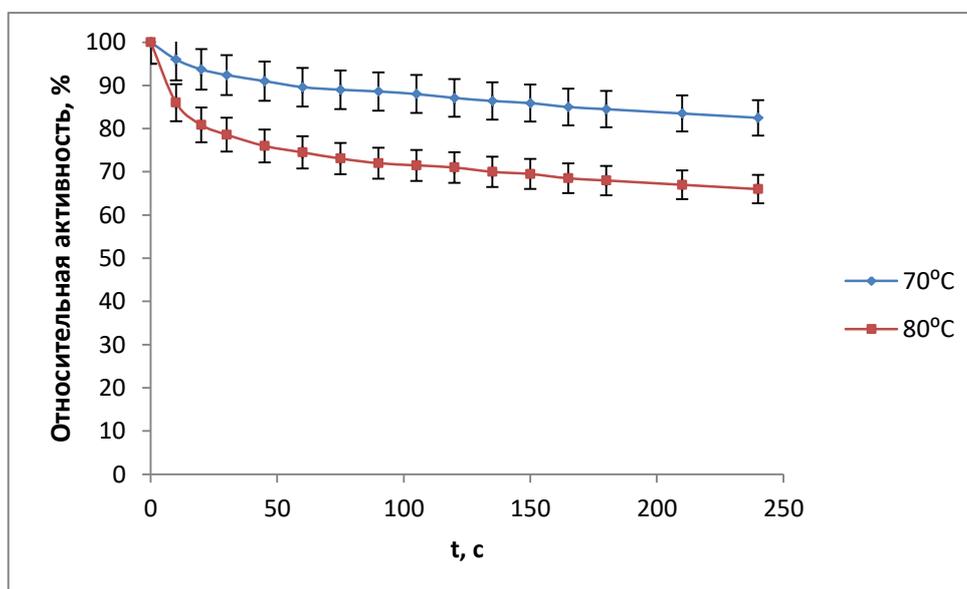
б)

Рисунок 26. Стабильность растворов Eg2 (а) и Eg2стаб (б) при длительном воздействии повышенных температур (рН 5,0).

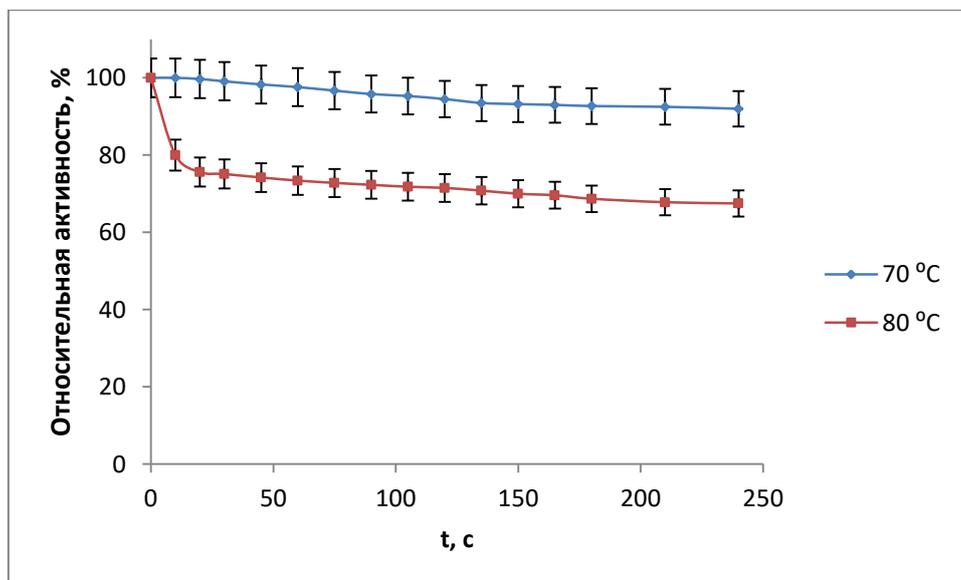
3.5.4 Стабильность Eg2 и Eg2стаб в растворе при кратковременном воздействии высоких температур

Аналогично ксиланазам мы изучали стабильность Eg2 и Eg2стаб в растворе при 70 и 80°C на протяжении 4 мин. Полученные результаты были представлены в виде зависимостей остаточной активности от времени, где за 100% была принята активность препарата до воздействия высоких температур.

Как видно из рисунка 26а, при нагревании до 70°C Eg2 за 4 мин сохраняет около 80%, а при 80°C - 65% исходной активности. По сравнению с нативной формой, Eg2стаб несколько более стабильна в условиях, имитирующих процесс пелитизации кормов: при 70°C Eg2стаб за 4 мин потеряла лишь 10% исходной активности. При 80°C обе формы фермента ведут себя практически одинаково.



а)

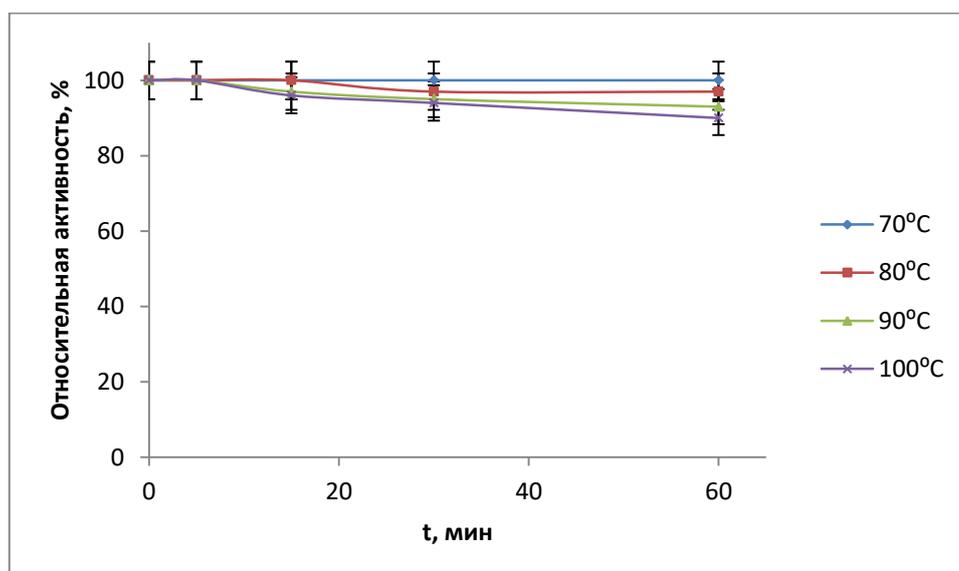


б)

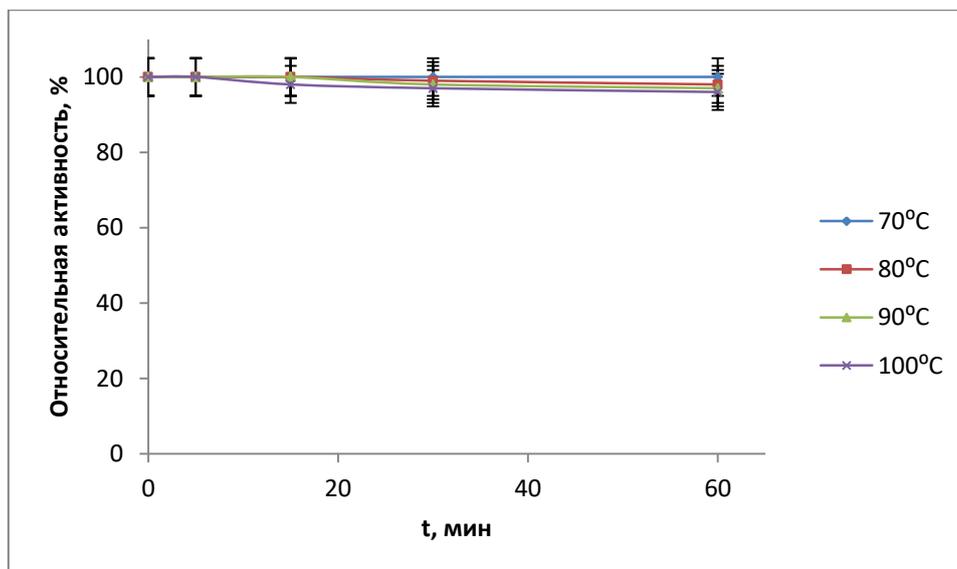
Рисунок 26. Стабильность Eg2 (а) и Eg2стаб (б) при 70 и 80°C в растворе (pH5,0).

3.5.5 Стабильность Eg2 и Eg2стаб в сухом виде при кратковременном воздействии высоких температур

Действуя по стандартной схеме, мы провели сравнительное изучение стабильности сухой формы Eg2 и Eg2стаб при 70, 80, 90 и 100°C. Полученные результаты были представлены в виде зависимостей остаточной активности от времени, где за 100% была принята активность фермента до воздействия высоких температур (рис. 27).



а)



б)

Рисунок 27. Стабильность Eg2 (а) и Eg2стаб (б) при 70, 80, 90 и 100°C в сухом виде.

Как видно из представленных данных, обе формы фермента в сухом виде при нагревании до 70 и 80°C в течение часа практически не теряют активность. Небольшая разница появляется при повышении температуры до 90 и 100°C: Eg2 сохраняет около 90%, а Eg2стаб - порядка 95% исходной активности через час инкубации.

3.6 Сравнительное исследование PhyA и PhyАстаб

3.6.1 Выделение и очистка PhyA и PhyАстаб

PhyA и PhyA стаб выделяли из препаратов #3536 и #3.695.1 соответственно.

По аналогии с выделением описанных выше ферментов, для выделения PhyA и PhyАстаб нами была выбрана методика, включающая в себя стадию предварительной очистки ФП (осаждение сульфатом аммония и последующая ГПХ низкого давления) и стадии хроматографического фракционирования методами анионообменной и гидрофобной хроматографии. Анионообменную хроматографию вели на колонке Source 15Q (объём 30 мл) в 20 мМ bis-Tris/HCl, pH 6,8, в линейном градиенте 1М NaCl (от 0 до 40%, рисунок 29).

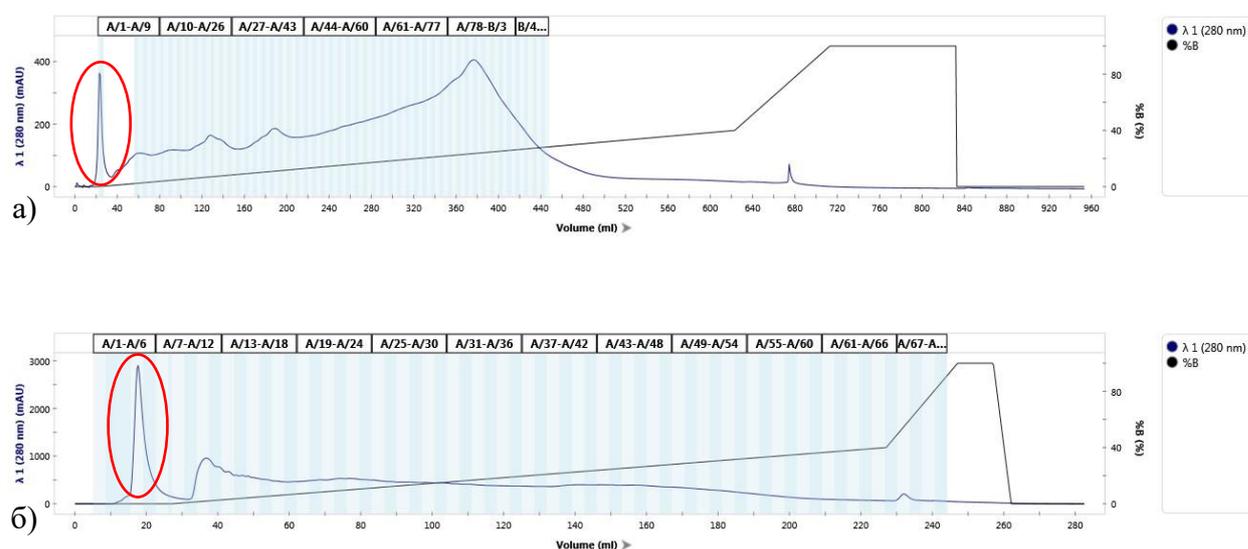


Рисунок 29. Хроматограммы, полученные после разделения ФП #3536, содержащего PhyA (а), и ФП #3.695.1, содержащего PhyАстаб (б) на колонке с анионообменным носителем.

В полученных после анионообменной хроматографии фракциях была определена активность по фитату натрия, а также были проведены ДДС-ЭФ в ПААГ. По результатам этих анализов фракции А1-А3 (см. хроматограмму для ФП #3536, содержащего PhyA) и фракции А5-А9 (см. хроматограмму для ФП #3.695.1, содержащего PhyАстаб), выходящие до градиента соли, были объединены. Эти фракции содержали максимальное количество белка с массой порядка 63 кДа и обладали наибольшей активностью по фитату натрия. ДДС-ЭФ полученных объединённых фракций (ОФ) приведены на рисунке 30. Полученные ОФ, обогащённые искомыми ферментами, подвергли дальнейшему разделению на колонке с гидрофобным носителем.

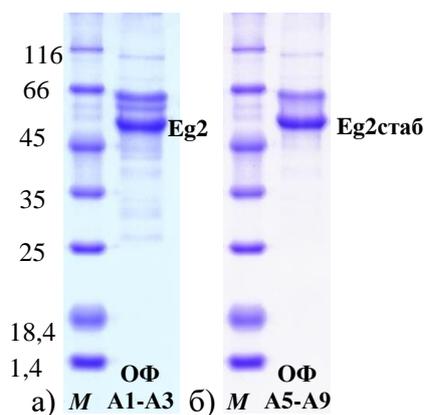


Рисунок 30. а) ДДС-ЭФ ОФ А1-А3, полученной после анионообменной хроматографии ФП #3536, содержащего PhyA; б) ДДС-ЭФ ОФ А5-А9, полученной после анионообменной хроматографии ФП #3.695.1, содержащего PhyАстаб.

Предварительно к ОФ был добавлен сульфат аммония до концентрации 1,7 М. Для разделения использовали колонку с гидрофобным носителем Source15Iso объемом 10мл. Разделение проводили в 50 мМ Na-ацетатном буфере, рН 5,0, в линейном градиенте 1,7 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ от (100 до 0% за 20 объемов колонки). Полученные хроматограммы представлены на рисунке 31.

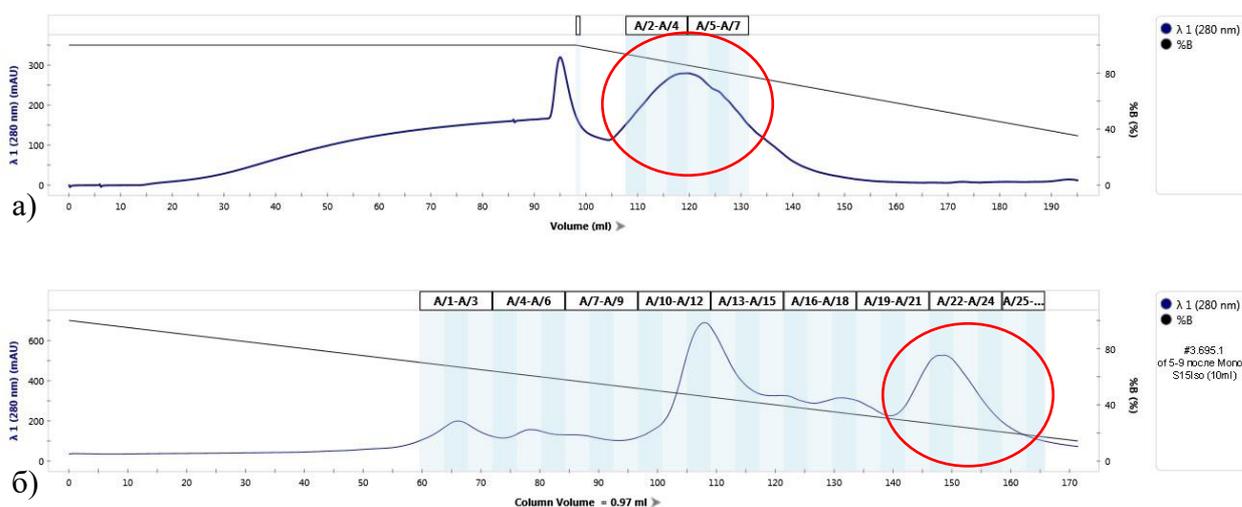


Рисунок 31. Хроматограммы, полученные после гидрофобного разделения ОФ А1-А3, собранной в ходе анионообменной хроматографии ФП #3536, содержащей PhyA (а), и ОФ А5-А9, собранной в ходе анионообменной хроматографии ФП #3.695.1, содержащей PhyАстаб.

Для полученных в ходе гидрофобной хроматографии ОФ А2-А7 (рисунок 31а) и ОФ А20-А25 (рисунок 31б) были проведены ДДС-ЭФ в ПААГ, определены активности по фитату натрия и общее содержание белка (по поглощению на длине волны 280 нм, A_{280}).

Согласно ДДС-ЭФ, полученные фракции содержали гомогенные PhyA и PhyАстаб (см. рисунок 32). Общие результаты эксперимента представлены в таблице 13.

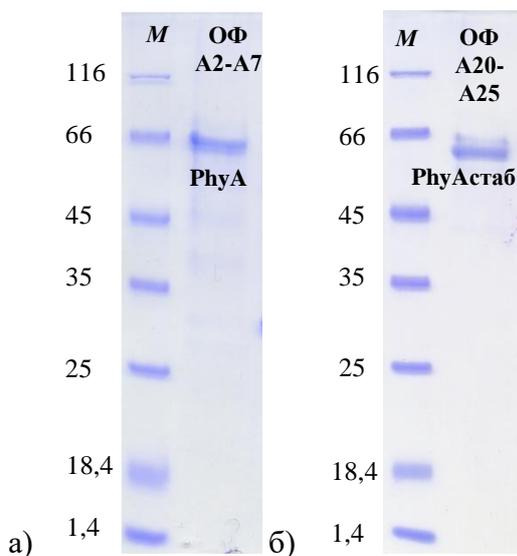


Рисунок 32. а) ДДС-ЭФ ОФ А2-А7, полученной после гидрофобной хроматографии ОФ А1-А3, содержащей PhyA; б) ДДС-ЭФ ОФ А20-А25, полученной после гидрофобной хроматографии ОФ А5-А9, содержащей PhyАстаб.

Таблица 13. Содержание белка и активность по фитату натрия в ОФ, полученных после гидрофобной хроматографии фракций, обогащённых PhyA и PhyАстаб.

№ ОФ	Фермент	Объём фракции, мл	Концентрация белка, мг/мл	Общий выход белка, мг	Активность по фитату натрия, ед/мл
А2-А7	PhyA	350	$0,34 \pm 0,02$	119 ± 6	62 ± 4
А20-А25	PhyАстаб	688	$0,16 \pm 0,01$	112 ± 6	36 ± 2

Часть ОФ (порядка 2/3 от общего объёма), содержащих PhyA и PhyАстаб подвергли ГПХ на колонке с носителем Bio-Gel P-4 (1 x 50 см, объём 50 мл) для обессоливания и замены буфера на 50 мМ NH₄Ac, pH5,5, после чего провели лиофильную сушку выделенных ферментов. В результате были получены высокоактивные PhyA и PhyАстаб в лиофилизированном виде (см. таблицу 14). Отметим, что удельная активность стабилизированного фермента была на 15% выше, чем нативного.

Таблица 14. Активность высушенных образцов PhуА и PhуАстаб, определённая по фитату натрия.

Фермент	Общий выход белка, мг	Активность по фитату натрия, ед/мг белка
PhуА	76 ± 4	177 ± 9
PhуАстаб	63 ± 3	209 ± 10

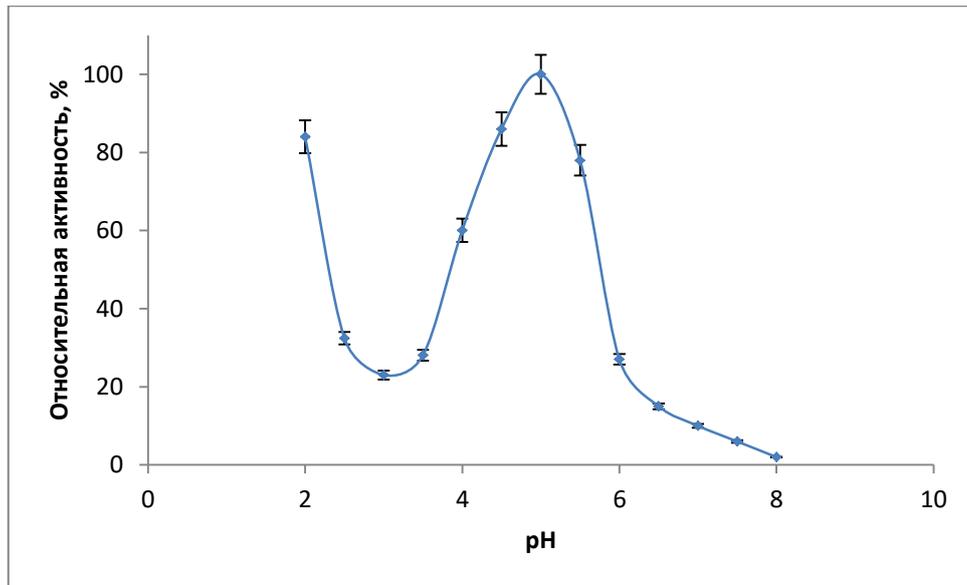
В результате проведённой очистки и разделения комплексных ФП #3536 и #3.695.1, нами было получено примерно по 180-210 мг гомогенных PhуА и PhуА стаб в активной форме как в растворённом, так и в сухом виде, пригодных для дальнейших исследований.

3.6.2 Влияние рН и температуры на активность PhуА и PhуАстаб

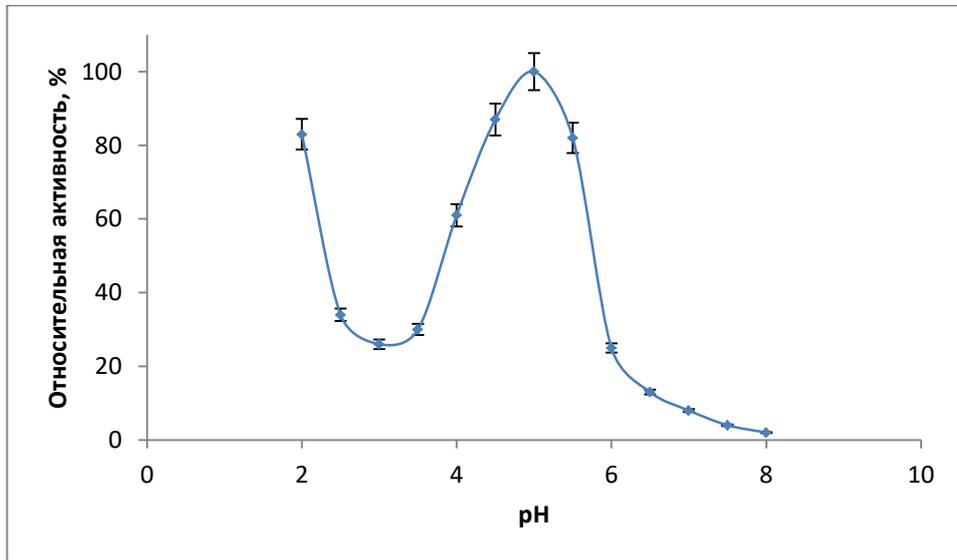
Нами были получены зависимости активности нативной и стабилизированной PhуА *A. niger* от рН в диапазоне 2,0-8,0 с шагом 0,5 единиц рН. Полученные рН-профили представлены на рисунке 24.

Как видно из рисунка, формы профилей зависимости активности нативной и стабилизированной PhуА от рН совпадают. Максимум активности обоих ферментов находится в слабокислой области и составляет рН5,0. Кроме того, оба фермента обладают повышенной (80% от максимально возможной) активностью в сильно кислой области (в районе рН2,0). Диапазон значений рН, при которых PhуА и PhуАстаб сохраняли 50% от максимальной активности, составил рН2,0-3,0 и рН4,0-5,5 для обеих форм.

Также нами была изучена зависимость активности нативной и стабилизированной PhуА от температуры. Полученные температурные профили представлены на рисунке 25. Как видно из рисунка, температура, при которой исследуемые ферменты проявляли наибольшую активность, составила 55°С в обоих случаях. Диапазон температур, при котором сохранялось более 50% от максимальной активности, составил 43-63°С для PhуА и 30-65°С для PhуАстаб. Отметим способность PhуАстаб катализировать гидролиз фитата натрия при 4°С, что не наблюдалось для PhуА.

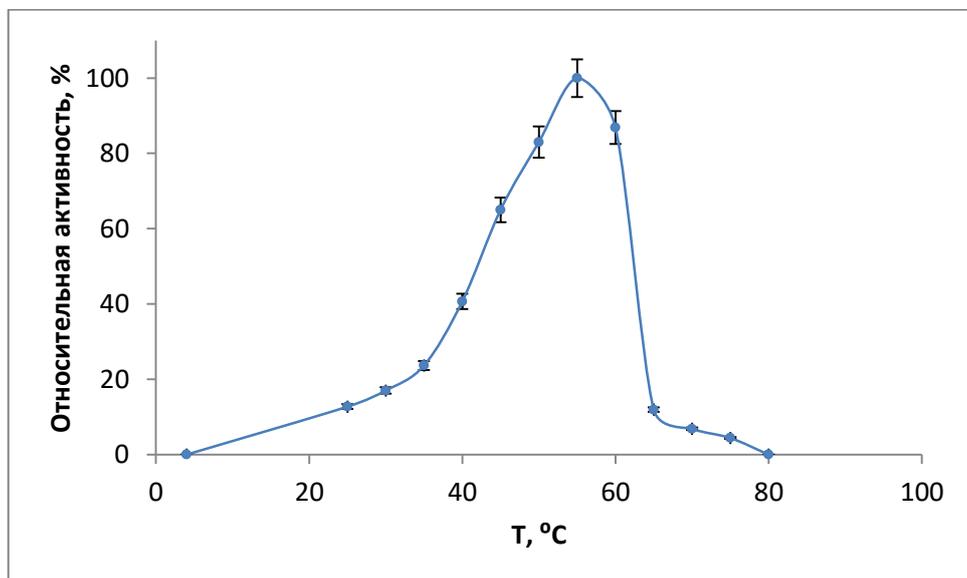


а)



б)

Рисунок 24. Зависимость активности PhyA (а) и PhyАстаб (б) от pH (50°C).



а)

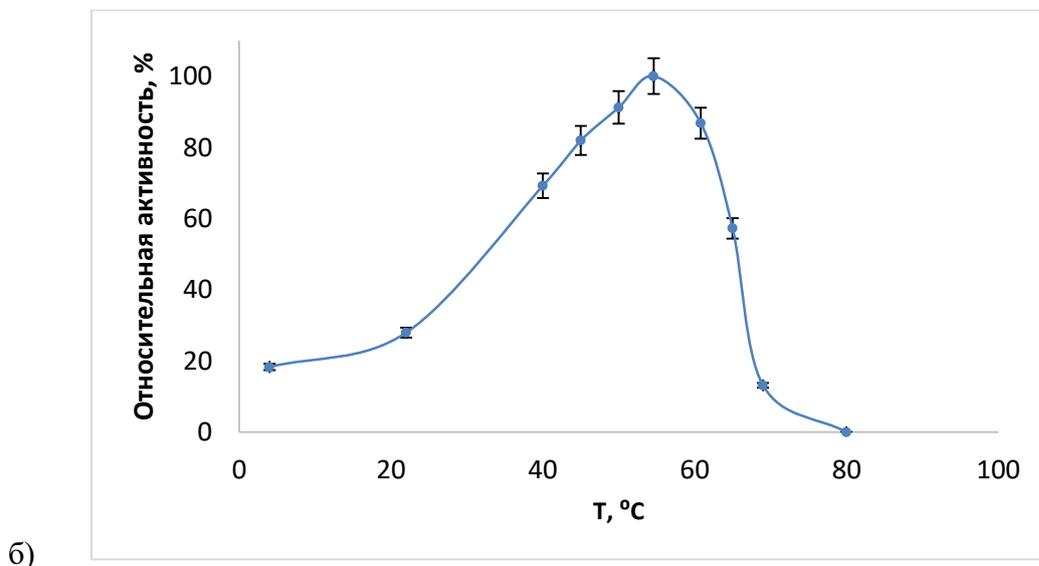


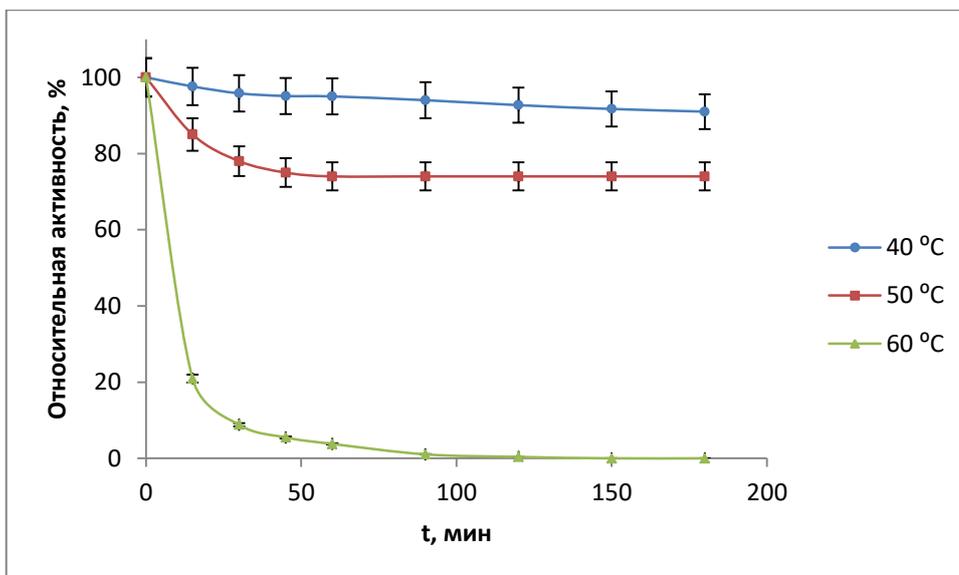
Рисунок 25. Зависимость активности PhyА (а) и PhyАстаб (б) от температуры (рН5,0).

3.6.3 Стабильность PhyА и PhyАстаб в растворе при длительном воздействии повышенных температур

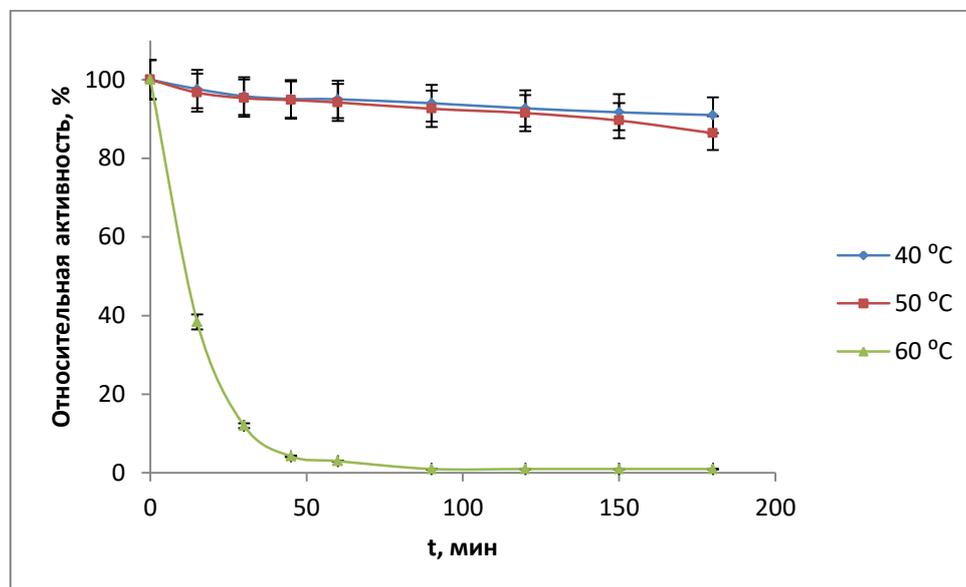
Как и для описанных в предыдущих главах ксиланаз и эндоглюканаз, помимо исследования зависимости активности PhyА и PhyАстаб от температуры, определенной при кратковременном (10 мин) воздействии этого фактора, нами была изучена способность ферментов сохранять свою активность при продолжительной (до 3 ч) инкубации в различных температурных условиях (40, 50 и 60°C) при рН 5,0.

Как видно из рисунка 26а, растворы PhyА проявляли не очень высокую устойчивость к продолжительному воздействию повышенных температур: если через 3 ч инкубации при 40°C фермент сохранял около 90% исходной активности, а при 50°C – около 75%, то инкубация при 60°C приводила к полной инактивации фермента за 1,5 ч, период полуинактивации составил менее 10 минут.

По сравнению с PhyА растворы PhyАстаб проявляли большую устойчивость к длительной инкубации. Так при 40°C фермент сохранял около 92%, а при 50°C - около 85% исходной активности за 3 ч инкубации (рисунок 26б). Период полуинактивации при 60°C увеличился до 13 мин.



а)



б)

Рисунок 26. Стабильность растворов PhyA (а) и PhyАстаб (б) при длительном воздействии повышенных температур (рН 5,0).

3.6.4 Стабильность PhyA и PhyАстаб в растворе при кратковременном воздействии высоких температур

Следуя стандартной для данной работы схеме характеристики гомогенных ферментов, мы изучили стабильность PhyA и PhyАстаб в условиях термошока, т.е. в растворе при 70 и 80°C на протяжении 4 мин. Полученные результаты были представлены в виде зависимостей остаточной активности от времени, где за 100% была принята активность фермента до воздействия высоких температур (см. рисунок 26а).

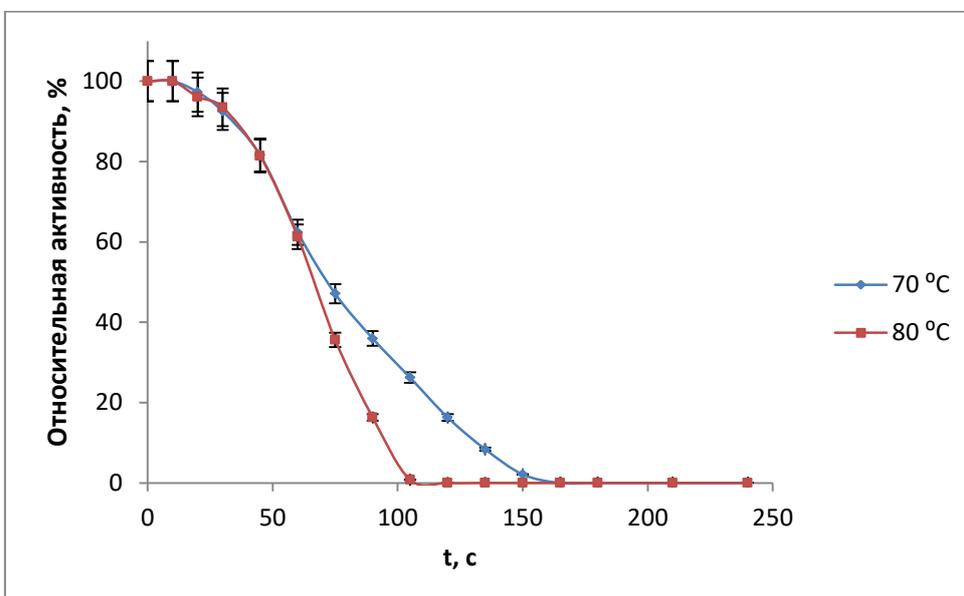
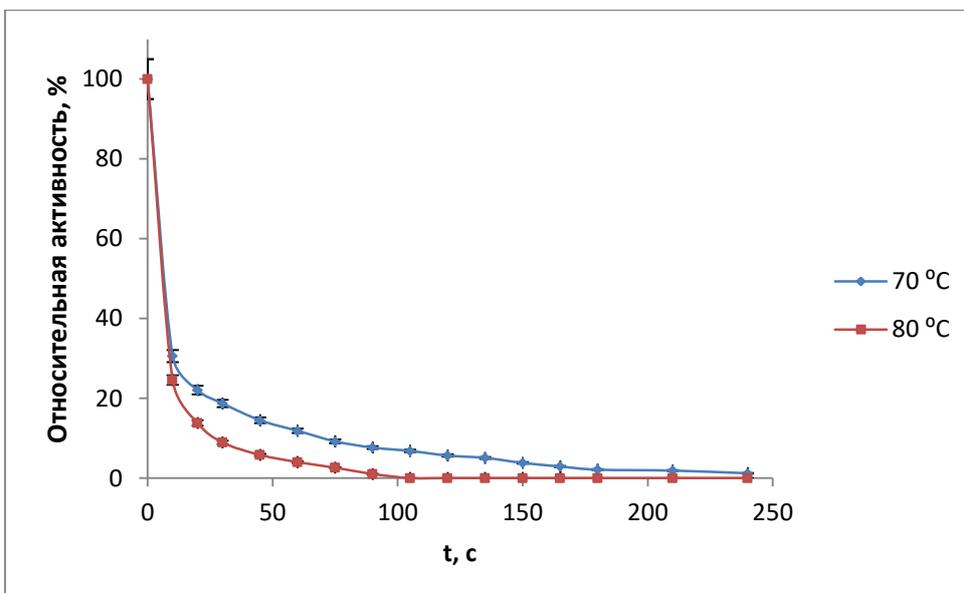


Рисунок 26. Стабильность PhyA (а) и PhyАстаб (б) при 70 и 80°C в растворе (pH5,0).

Как мы видим, даже кратковременное воздействие высоких температур на растворы PhyA приводит к немедленной инактивации фермента: и при 70°C, и при 80°C период полуинактивации составил менее 10 сек.

При действии повышенных температур на PhyАстаб в растворе наблюдалась более медленная инактивация фермента: период полуинактивации стабилизированного фермента по сравнению с нативным вырос более чем в 7 раз и составил около 75 сек. Отметим, что этого выигрыша во времени достаточно, чтобы в условиях процесса пелитизации сохранить активность фермента в промышленном препарате.

3.6.5 Стабильность PhuA и PhuАстаб в сухом виде при кратковременном воздействии высоких температур

Как и при исследовании ксиланаз и эндоглюканаз, мы провели сравнительное изучение стабильности PhuA и PhuАстаб при 70, 80, 90 и 100°C в сухом виде. Полученные результаты были представлены в виде зависимостей остаточной активности от времени, где за 100% была принята активность фермента до воздействия высоких температур.

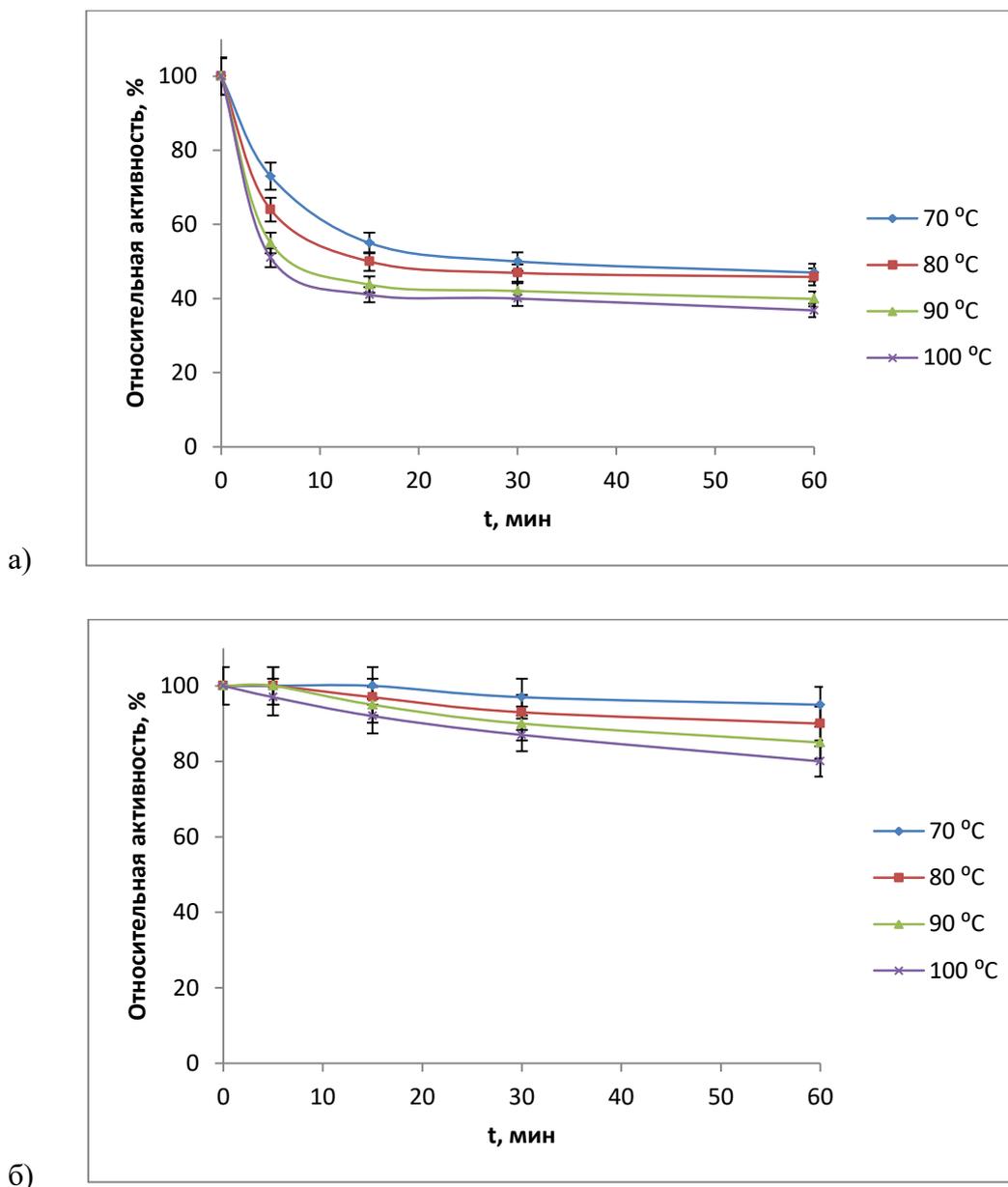


Рисунок 27. Стабильность PhuA (а) и PhuАстаб при 70, 80, 90 и 100°C в сухом виде.

Из всех трёх исследованных ферментов эффект стабилизации белковой молекулы ярче всего проявился в случае фитазы. Как видно рисунка 27, при воздействии высоких температур на PhuA за 1 ч происходило сильное уменьшение активности сухого

фермента: период полуинактивации составил 30 мин при 70°C, 15 мин при 80°C, 10 мин при 90°C и 5 мин при 100°C. Интересно, что после резкого падения активности в первые 10-30 мин от начала нагревания, в последующие 30 мин наблюдения PhuA в сухом виде активность уже практически не меняла, сохраняя её на уровне 40-50% от исходного значения. В отличие от нестабилизированной формы, PhuАстаб сохраняла при 70°C около 95%, при 80°C – около 90%, при 90°C – около 85% и при 100°C – около 80% исходной активности за час инкубации в сухом виде, что является весьма высоким результатом.

Выводы

1) Было показано, что новые комплексные ФП, существенно обогащенные как нативными XylE, Eg2, и PhyA, так и их стабилизированными аналогами (XylEстаб, Eg2стаб и PhyAстаб), проявляют высокую активность по отношению к различным НПС (целлюлозе, β -глюкану и ксилану), а также к фитату, причём активность по КМЦ и ксилану в 2-10 раз превышала таковую для ФП, полученного с помощью реципиентного штамма В1-537, а общая фитазная активность (отсутствующая у ФП, полученного с помощью реципиентного штамма В1-537) новых ФП составила 12000-55000 ед/г.

2) Методами ДДС-ЭФ и белковой хроматографии был изучен компонентный состав комплексных ФП, обогащённых XylE, Eg2 и PhyA, а также XylEстаб, Eg2стаб и PhyAстаб и показано, что они содержат около 16-17%/58% Eg2/Eg2стаб, 48-63%/70% XylE/XylEстаб, 40-50%/65% PhyA/PhyAстаб и 17-30% ЦБГ от общего содержания белка, тогда как ФП, полученный на основе штамма-реципиента, содержал около 1,4% Eg2, 60% ЦБГ, и не содержал XylE и PhyA.

2) В результате исследования свойств комплексных ФП на основе Eg2стаб, XylEстаб и PhyAстаб, было обнаружено, что оптимальным значением рН для целлюлазной (по отношению к КМЦ) и ксиланазной активности было рН 4,0, а для фитазной активности – рН 5,0. ФП проявляли указанные активности в широком диапазоне значений рН (в том числе при физиологических значениях 3 и 7). ФП, обогащенные Eg2стаб, XylEстаб и PhyAстаб проявляли целлюлазную, ксиланазную и фитазную активность в диапазоне температур от 20 до 80°C с максимумами при 70, 60 и 55°C соответственно.

3) ФП на основе Eg2стаб, XylEстаб и PhyAстаб проявили высокую стабильность в растворах при умеренных температурах, сохраняя 80-95% исходной активности за 3 ч инкубации при 40-60°C. Исключение составил ФП PhyAстаб при 60°C: через 1,5 ч инкубации происходила полная инактивация, а период полуинактивации составил менее 15 минут.

4) Хорошие результаты показали новые ФП и в условиях, моделирующего процесс пелитизации кормов (4 мин, 70-80°C в растворе): при 70°C активность ФП на основе XylEстаб не снижалась, период полуинактивации при 80°C составил 120 сек. ФП на основе Eg2стаб сохранял 85% и 65% исходной активности при 70 и 80°C, соответственно. Для ФП на основе PhyAстаб, период полуинактивации при 70 и 80°C составил около 75 сек.

- 5) Отличные результаты принесли испытания сухих ФП на основе Eg2стаб, ХуlЕстаб и РһуАстаб в условиях жёсткого температурного воздействия (70-100°C, 1 ч): все ФП за час сохраняли свои исходные свойства на 80-100%.
- 6) Методами белковой хроматографии был выделены в гомогенном виде ХуlЕ, Eg2, РһуА, а также ХуlЕстаб, Eg2стаб и РһуАстаб и проведено сравнительное изучение их свойств.
- 7) Показано, что «нативные» и стабилизированные формы ферментов обладали (попарно) примерно одинаковыми и достаточно высокими удельными активностями по отношению к специфическим субстратам.
- 8) Оптимальные значения рН обеих эндоглюканаз, равно как и фитаз совпадали и составили $pH_{opt}4,0$ и $pH_{opt}5,0$, соответственно. В случае ксиланаз рН оптимумы немного различались и составили $pH_{opt}4,0$ для ХуlЕстаб и $pH_{opt}5,0$ для ХуlЕ.
- 9) Температурные оптимумы активности при переходе от исходной к стабилизированной форме фермента не изменились для эндоглюканазы и фитазы (55 и 60°C, соответственно) и выросли от 65 и 70°C для ксиланазы.
- 10) Растворы стабилизированных ферментов проявляли большую устойчивость к длительной инкубации при температурах 40-60°C, чем растворы исходных (положительный эффект колебался от 2 до 15%). Наиболее заметен был эффект стабилизации в условиях жёсткого температурного воздействия (1 ч при 70-100°C в сухом виде или 4 мин при 70-80°C в растворе), так например стабильность РһуАстаб выросла в 7 раз по сравнению с РһуА.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Rennie E.A., Scheller H.V. Xylan biosynthesis // *Current Opinion in Biotechnology*. 2014. Vol. 26. P. 100–107.
2. Scheller H.V., Ulvskov P. Hemicelluloses // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010. Vol. 61, № 1. P. 263–289.
3. Ebringerová A., Hromádková Z., Heinze T. Hemicellulose // *Polysaccharides I* / ed. Heinze T. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. Vol. 186. P. 1–67.
4. Darvill J.E. et al. Structure of Plant Cell Walls: XI. GLUCURONOARABINOXYLAN, A SECOND HEMICELLULOSE IN THE PRIMARY CELL WALLS OF SUSPENSION-CULTURED SYCAMORE CELLS // *Plant Physiol.* 1980. Vol. 66, № 6. P. 1135–1139.
5. York W.S., O'Neill M.A. Biochemical control of xylan biosynthesis — which end is up? // *Current Opinion in Plant Biology*. 2008. Vol. 11, № 3. P. 258–265.
6. Bromley J.R. et al. GUX1 and GUX2 glucuronyltransferases decorate distinct domains of glucuronoxylan with different substitution patterns // *The Plant Journal*. 2013. Vol. 74, № 3. P. 423–434.
7. Balakshin M. et al. Quantification of lignin–carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy // *Planta*. 2011. Vol. 233, № 6. P. 1097–1110.
8. Gilbert H.J., Hazlewood G.P. Bacterial cellulases and xylanases // *Microbiology*. Microbiology Society, 1993. Vol. 139, № 2. P. 187–194.
9. Gilbert H.J. et al. Molecular cloning of multiple xylanase genes from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* // *Microbiology*. Microbiology Society, 1988. Vol. 134, № 12. P. 3239–3247.
10. Yang R.C. et al. Identification of two distinct *Bacillus circulans* xylanases by molecular cloning of the genes and expression in *Escherichia coli* // *Applied and environmental microbiology*. Am Soc Microbiol, 1989. Vol. 55, № 3. P. 568–572.
11. Biely P., Markovič O., Mislovičová D. Sensitive detection of endo-1, 4- β -glucanases and endo-1, 4- β -xylanases in gels // *Analytical biochemistry*. Elsevier, 1985. Vol. 144, № 1. P. 147–151.

12. Collins T., Gerday C., Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases // *FEMS Microbiol Rev.* 2005. Vol. 29, № 1. P. 3–23.
13. Larson S.B. et al. First crystallographic structure of a xylanase from glycoside hydrolase family 5: implications for catalysis // *Biochemistry.* ACS Publications, 2003. Vol. 42, № 28. P. 8411–8422.
14. Van Petegem F. et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a xylanase from the psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis* // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography.* International Union of Crystallography, 2002. Vol. 58, № 9. P. 1494–1496.
15. Derewenda U. et al. Crystal structure, at 2.6-Å resolution, of the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the F family of beta-1, 4-D-glycanases. // *Journal of biological chemistry.* Elsevier, 1994. Vol. 269, № 33. P. 20811–20814.
16. Törrönen A., Harkki A., Rouvinen J. Three-dimensional structure of endo-1, 4-beta-xylanase II from *Trichoderma reesei*: two conformational states in the active site. // *The EMBO journal.* 1994. Vol. 13, № 11. P. 2493–2501.
17. Kleywegt G.J. et al. The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes // *Journal of molecular biology.* Elsevier, 1997. Vol. 272, № 3. P. 383–397.
18. Nurizzo D. et al. *Cellvibrio japonicus* α-L-arabinanase 43A has a novel five-blade β-propeller fold // *Nature structural biology.* Nature Publishing Group US New York, 2002. Vol. 9, № 9. P. 665–668.
19. Nolling J. et al. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum* // *Journal of bacteriology.* Am Soc Microbiol, 2001. Vol. 183, № 16. P. 4823–4838.
20. da Silva A.R. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities // *Nature.* Nature Publishing Group UK London, 2002. Vol. 417, № 6887. P. 459–463.
21. Kunst F. et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* // *Nature.* Nature Publishing Group UK London, 1997. Vol. 390, № 6657. P. 249–256.

22. Xu J. et al. A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis // Science. American Association for the Advancement of Science, 2003. Vol. 299, № 5615. P. 2074–2076.
23. Whitehead T.R. Analyses of the gene and amino acid sequence of the Prevotella (Bacteroides) ruminicola 23 xylanase reveals unexpected homology with endoglucanases from other genera of bacteria // Current microbiology. Springer, 1993. Vol. 27. P. 27–33.
24. Foong F. et al. Nucleotide sequence and characteristics of endoglucanase gene engB from Clostridium cellulovorans // Microbiology. Microbiology Society, 1991. Vol. 137, № 7. P. 1729–1736.
25. Cho K.K. et al. Molecular cloning and expression of a novel family A endoglucanase gene from Fibrobacter succinogenes S85 in Escherichia coli // Enzyme and microbial technology. Elsevier, 2000. Vol. 27, № 7. P. 475–481.
26. Poole D.M. et al. Nucleotide sequence of the Ruminococcus albus SY3 endoglucanase genes ce1A and ce1B // Molecular and General Genetics MGG. Springer, 1990. Vol. 223. P. 217–223.
27. Saloheimo M.L. et al. Xylanase from trichoderma reesei, method for production thereof, and methods employing this enzyme. Google Patents, 2004.
28. Braun E.J., Rodrigues C.A. Purification and properties of an endoxylanase from a corn stalk rot strain of Erwinia chrysanthemi // Phytopathology. 1993. Vol. 83, № 3. P. 332–338.
29. GILKES N.R. et al. Structural and functional relationships in two families of β -1, 4-glycanases // European Journal of Biochemistry. Wiley Online Library, 1991. Vol. 202, № 2. P. 367–377.
30. Biely P. et al. Endo- β -1, 4-xylanase families: differences in catalytic properties // Journal of biotechnology. Elsevier, 1997. Vol. 57, № 1–3. P. 151–166.
31. Claeysens M., Henrissat B. Specificity mapping of cellulolytic enzymes: classification into families of structurally related proteins confirmed by biochemical analysis // Protein Science. Wiley Online Library, 1992. Vol. 1, № 10. P. 1293–1297.
32. BRAY M.R., CLARKE A.J. Action pattern of xylo-oligosaccharide hydrolysis by Schizophyllum commune xylanase A // European journal of biochemistry. Wiley Online Library, 1992. Vol. 204, № 1. P. 191–196.

33. Biely P. Diversity of Microbial Endo- β -1, 4-Xylanases. ACS Publications, 2003.
34. Gosalbes M.J. et al. Two beta-glycanase genes are clustered in *Bacillus polymyxa*: molecular cloning, expression, and sequence analysis of genes encoding a xylanase and an endo-beta-(1, 3)-(1, 4)-glucanase // *Journal of bacteriology. Am Soc Microbiol*, 1991. Vol. 173, № 23. P. 7705–7710.
35. Biely P. et al. Catalytic properties of endo-beta-1, 4-xylanases of *Trichoderma reesei* // 2nd Tricel symposium on *Trichoderma reesei* cellulases and other hydrolases (TRICEL93). 1993. P. 125–135.
36. Alzari P.M., ne Souchon H., Dominguez R. The crystal structure of endoglucanase CelA, a family 8 glycosyl hydrolase from *Clostridium thermocellum* // *Structure. Elsevier*, 1996. Vol. 4, № 3. P. 265–275.
37. Rye C.S., Withers S.G. Glycosidase mechanisms // *Current opinion in chemical biology. Elsevier*, 2000. Vol. 4, № 5. P. 573–580.
38. Dotsenko A.S. et al. Enhancement of thermostability of GH10 xylanase E *Penicillium canescens* directed by $\Delta\Delta G$ calculations and structure analysis // *Enzyme and Microbial Technology*. 2021. Vol. 152. P. 109938.
39. Байкыз Н., Сегал Л. Целлюлоза и ее производные // Н. Байкыз, Л. Сегал.–М.: Наука. 1974.
40. Izydorczyk M.S., Macri L.J., MacGregor A.W. Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides—I. Water-extractable β -glucans and arabinoxylans // *Carbohydrate polymers. Elsevier*, 1998. Vol. 35, № 3–4. P. 249–258.
41. Doherty W.O., Mousavioun P., Fellows C.M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers // *Industrial crops and products. Elsevier*, 2011. Vol. 33, № 2. P. 259–276.
42. Синицын А.П. et al. Биотехнология ферментативного превращения целлюлозы // *Итоги науки и техники. Биотехнология*. 1988. Vol. 12. P. 55–57.
43. Zhu F., Du B., Xu B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans // *Food Hydrocolloids. Elsevier*, 2016. Vol. 52. P. 275–288.
44. Murphy E.J. et al. β -Glucans // *Encyclopedia. MDPI*, 2021. Vol. 1, № 3. P. 831–847.

45. McIntosh M., Stone B.A., Stanisich V.A. Curdlan and other bacterial (1→ 3)- β -D-glucans // *Applied microbiology and biotechnology*. Springer, 2005. Vol. 68. P. 163–173.
46. Schülein M. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens* // *Journal of biotechnology*. Elsevier, 1997. Vol. 57, № 1–3. P. 71–81.
47. Mansfield S.D., Saddler J.N., Gübitz G.M. Characterization of endoglucanases from the brown rot fungi *Gloeophyllum sepiarium* and *Gloeophyllum trabeum* // *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier, 1998. Vol. 23, № 1–2. P. 133–140.
48. Bhat K.M., McCrae S.I., Wood T.M. The endo-(1→ 4)- β -d-glucanase system of *Penicillium pinophilum* cellulase: Isolation, purification, and characterization of five major endoglucanase components // *Carbohydrate research*. Elsevier, 1989. Vol. 190, № 2. P. 279–297.
49. Takashima S. et al. Overproduction of recombinant *Trichoderma reesei* cellulases by *Aspergillus oryzae* and their enzymatic properties // *Journal of Biotechnology*. Elsevier, 1998. Vol. 65, № 2–3. P. 163–171.
50. Claeysens M., Nerinckx W., Piens K. Carbohydrates from *Trichoderma reesei* and other microorganisms. Royal Society of Chemistry, 1998.
51. Wu S., Wu S. Processivity and the mechanisms of processive endoglucanases // *Applied biochemistry and biotechnology*. Springer, 2020. Vol. 190, № 2. P. 448–463.
52. Dotsenko A.S. et al. Critical effect of proline on thermostability of endoglucanase II from *Penicillium verruculosum* // *Biochemical Engineering Journal*. Elsevier, 2019. Vol. 152. P. 107395.
53. Dotsenko A.S. et al. Protein surface engineering of endoglucanase *Penicillium verruculosum* for improvement in thermostability and stability in the presence of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid // *Bioresource technology*. Elsevier, 2020. Vol. 296. P. 122370.
54. Thomas M.P., Mills S.J., Potter B.V. The “other” inositols and their phosphates: synthesis, biology, and medicine (with recent advances in myo-inositol chemistry) // *Angewandte Chemie International Edition*. Wiley Online Library, 2016. Vol. 55, № 5. P. 1614–1650.

55. Hou H.J., Chang K.C. Yield and textural properties of tofu as affected by the changes of phytate content during soybean storage // *Journal of food science*. Wiley Online Library, 2003. Vol. 68, № 4. P. 1185–1191.
56. Majumder S., Datta K., Datta S.K. Rice biofortification: high iron, zinc, and vitamin-A to fight against “hidden hunger” // *Agronomy*. MDPI, 2019. Vol. 9, № 12. P. 803.
57. Vohra A., Satyanarayana T. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications // *Critical Reviews in Biotechnology*. Taylor & Francis, 2003. Vol. 23, № 1. P. 29–60.
58. Lei X.G., Porres J.M. Phytase enzymology, applications, and biotechnology // *Biotechnology letters*. Springer, 2003. Vol. 25. P. 1787–1794.
59. Selle P.H., Gill R.J., Scott T.A. Effects of pre-pelleted wheat and phytase supplementation on broiler growth performance and nutrient utilisation. // *Proceedings of the 19th Australian Poultry Science Symposium*, Sydney, New South Wales, Australia, 12-14 February 2007. Poultry Research Foundation, 2007. P. 182–185.
60. Ragon M. et al. Structure of *Debaryomyces castellii* CBS 2923 phytase // *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*. International Union of Crystallography, 2009. Vol. 65, № 4. P. 321–326.
61. Karbalaee M., Rezaee S.A., Farsiani H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins // *Journal of cellular physiology*. Wiley Online Library, 2020. Vol. 235, № 9. P. 5867–5881.
62. Bohn L., Meyer A.S., Rasmussen S.K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding // *Journal of Zhejiang University Science B*. Springer, 2008. Vol. 9, № 3. P. 165–191.
63. *Inositol phosphates: linking agriculture and the environment*. 1st ed. / ed. Turner B.L., Richardson A.E., Mullaney E.J. UK: CABI, 2007.
64. Ramirez E.C. et al. *Handbook of food enzymology // Polyphenol oxidase*. Marcel Decker New York, NY, 2003. P. 509–523.
65. Vogel A., Spener F., Krebs B. Purple Acid Phosphatase // *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry* / ed. Scott R.A. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2011. P. eibc0582.

66. Kumar V. et al. β -Propeller phytases: Diversity, catalytic attributes, current developments and potential biotechnological applications // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017. Vol. 98. P. 595–609.
67. Oh B.-C. et al. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004. Vol. 63, № 4. P. 362–372.
68. Rao D.E.C.S. et al. Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: An overview // *Critical Reviews in Biotechnology*. 2009. Vol. 29, № 2. P. 182–198.
69. Рязанцев М., Дуборезов В. Влияние уровня кормления на продуктивность и сервис-период молочных коров // *Комбикорма. РЕДАКЦИЯ ЖУРНАЛА КОМБИКОРМА*, 2021. P. Выпуск 6 2021.
70. Glick B.R., Patten C.L. *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. John Wiley & Sons, 2022.
71. Синицын А.П. et al. Возможности экспрессионной системы гриба *Penicillium verruculosum* для получения продуцентов ферментов, обеспечивающих эффективную деструкцию возобновляемой растительной биомассы (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология. Федеральное государственное бюджетное учреждение " Российская академия наук"*, 2020. Vol. 56, № 6. P. 551–560.
72. Sinitsyn A.P., Rozhkova A.M. *Penicillium canescens* host as the platform for development of a new recombinant strain producers of carbohydrases // *Microorganisms in biorefineries*. Springer, 2015. P. 1–19.
73. Morozova V.V. et al. Cellulases of *Penicillium verruculosum* // *Biotechnology Journal*. 2010. Vol. 5, № 8. P. 871–880.
74. Sinitsyn A.P. et al. The production of highly effective enzyme complexes of cellulases and hemicellulases based on the *Penicillium verruculosum* strain for the hydrolysis of plant raw materials // *Appl Biochem Microbiol*. 2014. Vol. 50, № 8. P. 761–772.
75. Berlin A. et al. Evaluation of cellulase preparations for hydrolysis of hardwood substrates // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Springer, 2006. Vol. 130. P. 528–545.
76. Juturu V., Wu J.C. *Microbial cellulases: Engineering, production and applications* // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014. Vol. 33. P. 188–203.

77. Barati B., Sadegh Amiri I. In Silico Engineering of Disulphide Bonds to Produce Stable Cellulase. Singapore: Springer Singapore, 2015.
78. Murashima K., Kosugi A., Doi R.H. Thermostabilization of cellulosomal endoglucanase EngB from *Clostridium cellulovorans* by in vitro DNA recombination with non-cellulosomal endoglucanase EngD: Thermostabilization of endoglucanase EngB from *C. cellulovorans* // *Molecular Microbiology*. 2002. Vol. 45, № 3. P. 617–626.
79. Endelman J.B. et al. Site-directed protein recombination as a shortest-path problem // *Protein Engineering Design and Selection*. 2004. Vol. 17, № 7. P. 589–594.
80. Taylor C.B. et al. Computational Investigation of Glycosylation Effects on a Family 1 Carbohydrate-binding Module // *Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 287, № 5. P. 3147–3155.
81. Beckham G.T. et al. Harnessing glycosylation to improve cellulase activity // *Current Opinion in Biotechnology*. 2012. Vol. 23, № 3. P. 338–345.
82. Джонс К. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., «Справочник биохимика»; -М; « Мир, 1991.
83. Синицын А.П. et al. Получение высокоэффективных ферментных комплексов целлюлаз и гемицеллюлаз для гидролиза растительного сырья на основе штамма *Penicillium verruculosum* // *Биотехнология. Федеральное государственное бюджетное учреждение Государственный научно ...*, 2013. Vol. 29, № 5. P. 40–53.
84. Синицын А.П. et al. Получение и свойства новых биокатализаторов, предназначенных для разрушения некрахмальных растительных полисахаридов // *Катализ в промышленности. Общество с ограниченной ответственностью Калвис*, 2017. № 4. P. 331–338.
85. КОНДРАТЬЕВА Е. et al. Конструирование рекомбинантных продуцентов ферментных препаратов для кормопроизводства с помощью экспрессионной системы на основе гриба *Penicillium verruculosum* // *Биотехнология*. 2019. Vol. 35, № 4.