

УДК 579.66

## Экспрессия гена ксиланазы из *Paenibacillus brasilensis* X1 в *Pichia pastoris* и характеристика рекомбинантного белка

© 2018 А.Н. КАЛИНИНА<sup>1</sup>\*, Т.Л. ГОРДЕЕВА<sup>1</sup>, С.П. СИНЕОКИЙ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»–ГосНИИгенетика), 117545 Москва

\*e-mail: anna.kalininaa@yandex.ru

Поступила 12.10.2018 г.

После доработки 15.11.2018 г.

Принята в печать 15.12.2018 г.

Описана изоляция, гетерологическая экспрессия и характеристика новой ксиланазы из *Paenibacillus brasilensis*. Ген *xyll* из штамма *P. brasilensis* X1 ВКПМ В-13092, состоящий из 639 нуклеотидов, кодирует эндо-1,4-β-ксиланазу (ЕС 3.2.1.8) из 184 аминокислот и 28 остатков предполагаемого сигнального пептида в N-концевой области. Нуклеотидная последовательность гена *xyll* и аминокислотная последовательность зрелого белка XyII имеют наибольшую гомологию с последовательностями эндо-1,4-β-ксиланаз *Bacillus subtilis* (78% и 83% соответственно). Фрагмент гена, кодирующий зрелый белок, был экспрессирован в *Pichia pastoris*. Очищенный рекомбинантный фермент XyII показал активность на ксилане березы и арабиноксилане. При использовании ксилана березы в качестве субстрата оптимальный pH 6, а оптимальный интервал температур составил 40–50 °С. Значение удельной активности ксиланазы составило 1660 ед/мг белка,  $K_m$  и  $V_{max}$  имели значения 1,13 мг/мл и 5124,3 мкмоль/мин·мг, соответственно. Рекомбинантный белок XyII показал высокую pH- и термостабильность, устойчивость к пищеварительным ферментам и белковым ингибиторам ксиланаз зерна. Показано также, что ионы  $Mn^{2+}$  и  $Co^{2+}$  оказывают позитивное влияние на активность фермента.

*Ключевые слова:* ксиланаза, ксилан, *Paenibacillus brasilensis*, *Pichia pastoris*

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-22-32

Ксилан является основным структурным полисахаридом растительных клеток и вторым после целлюлозы наиболее распространенным полисахаридом в природе [1]. Это комплексный полисахарид, основная цепь которого состоит из остатков β-D-ксилозы, соединенных между собой β-(1,4)-связями с небольшим количеством β-(1-3) ответвлений [2]. В зависимости от вида растения, из которого получен ксилан, в состав его боковой цепи могут быть включены ацетильные, арабинозные, глюкуроновые, метил-глюкуроновые остатки. Ксилан из боль-

шинства растительных источников существует в виде гетерополисахарида, в котором к C-2 атомам ксилозы присоединены 4-O-метил α-D-глюкуроновые остатки [3].

Полная деградация ксилана требует комплекса ксиланолитических ферментов, включающих эндоксиланазу, ксилозидазу, глюкуронидазу, ацетилэстеразу и арабинофуранозидазу [4].

Основную роль в разрушении ксилана играет эндоксиланаза (эндо-1,4-β-ксиланаза, ЕС 3.2.1.8), которая катализирует случайный гидролиз ксилана до ксилоолигосахаридов.

*Список сокращений:* БРЦ ВКПМ – Национальный биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов; ДНС-метод – метод определения ферментативной активности ксиланазы с ДНС-реактивом (DNS); КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; ПААГ-электрофорез – полиакриламидный гель-электрофорез; ПЦР – полимеразная цепная реакция; EDTA (ЭДТА) – этилендиаминтетрауксусная кислота; DNS (ДНС) – 3,5-динитросалициловая кислота (3,5-Dinitrosalicylic acid);  $K_m$  и  $V_{max}$  – константа Михаэлиса-Ментеня и максимальная скорость ферментативной реакции; SDS (СДС) – лаурилсульфат натрия; YPD-среда – Yeast Extract–Peptone–Dextrose Medium.

Ксиланазы широко используются в промышленности. Так, в пищевой промышленности ксиланазу применяют при производстве соков, растительных масел и вина [5–7]. Ксиланазы также применяются в хлебопекарной промышленности [5, 8, 9]. Использование ксиланаз в качестве кормовых добавок позволяет снизить вязкость корма в кишечнике животных, улучшая усвояемость и питательную ценность комбикормов [5, 10–12]. Ксиланазы нашли широкое применение при производстве бумаги, целлюлозы, крахмала и текстиля [5, 13–17], переработке растительного сырья и отходов пищевой промышленности [18–21].

Ксиланазы бактериального происхождения характеризуются высокой удельной активностью, термостабильностью, широким диапазоном рабочего интервала pH и температур, что делает возможным их использование в различных отраслях промышленности [22–35].

Эндоксиланазы некоторых видов семейства Bacillaceae были изучены ранее: *Bacillus subtilis* [22, 23], *B. pumilus* [24, 25], *B. weihenstephansensis* [26], *B. halodurans* [27], *B. licheniformis* [28, 29], *B. circulans* [30], *B. brevis* [31], *Paenibacillus* [32–35].

Актуальная задача состоит в поиске новых высокоактивных ксиланаз, обладающих свойствами, необходимыми при промышленном использовании. Для решения этой задачи ранее был проведен скрининг новых бактериальных штаммов-продуцентов ксиланаз, в результате которого был выделен штамм X1 ВКПМ В-13192, способный к росту на ксилане березы как единственном источнике углерода и обладающий значительной ксиланазной активностью. Анализ последовательности гена 16S RNA (GenBank MH991637) позволил идентифицировать штамм как *Paenibacillus brasiliensis* [36].

Цель данного исследования – клонирование и экспрессия гена ксиланазы из *Paenibacillus brasiliensis* X1 ВКПМ В-13192 в экспрессионной системе метилотрофных дрожжей *P. pastoris* и исследование свойств рекомбинантного фермента.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Микроорганизмы, питательные среды, плазмиды

Штамм *P. brasiliensis* X1, способный синтезировать ксиланазу, был изолирован из образца лесной почвы Московской обл. (Россия) и депонирован в БРЦ ВКПМ под номером В-13192.

Для экспрессии в дрожжевой системе был использован штамм *P. pastoris* ВКПМ Y-2837 (His-) и вектор pAOX2-GAP ВКПМ В-13126.

Для генно-инженерных работ был использован штамм *Escherichia coli* XL1-Blue (*endA1 supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac hsdR17 F'*[proAB lacI-qZΔM15 Tn10]) ВКПМ В-9838.

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

### Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей был проведен с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и NCBI ORF Finder tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Для поиска возможных сигнальных последовательностей была использована программа SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Множественное выравнивание последовательностей осуществляли с использованием программы CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Для исследования трехмерных структур ферментов использовали сервер SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) и базу NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=XGGZ1VF0014&mode=all>). Поиск сайтов гликозилирования осуществляли на сервере NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

### Клонирование гена

Для амплификации гена *xyl1*, кодирующего ксиланазу, были использованы праймеры Xyl-1 (5'-ATGTTTAAGTTTAGTNNRAR-3') и Xyl-2 (5'-TTACCACACCGTTABBVY-3').

Ген *xyl1* секвенировали и депонировали в базе Genbank (№ MK014302). Ген, кодирующий ксиланазу, клонировали в состав вектора pAOX2-GAP и экспрессировали в клетках *P. pastoris*. Вектор pAOX2-GAP в своем составе содержит: промотор GAP, сигнальную последовательность α-фактора *Saccharomyces cerevisiae*, полилинкерную область, терминатор транскрипции AOX1 гена, маркерный ген His4, области интеграции 5'AOX2 и 3'AOX2 в хромосому *P. pastoris*, ген устойчивости к ампициллину и pUC ori.

### Конструирование рекомбинантной экспрессионной плазмиды

Фрагмент ДНК, кодирующий зрелый белок Ху11, был амплифицирован методом ПЦР с использованием *Pfu* ДНК-полимеразы (Fermentas), двух праймеров Ху1Р-f 5'-aaagaattcgcgacagactactggcaaaat-3' и Ху1Р-r 5'-aaagcggccgcttaccacaccgttacgttaga-3'. Амплифицированный продукт, кодирующий зрелый фермент ксиланазу, был клонирован в состав вектора рАОХ2-GAP, в результате чего была получена рекомбинантная плаزمида рАОХ2-GAP-Ху1Р. Последовательность, кодирующая ксиланазу, была встроена в рамку считывания с сигнальной последовательностью вектора.

### Экспрессия гена, кодирующего ксиланазу Ху11 в *P. pastoris*, и выбор наиболее продуктивного клона

Плазмиды рАОХ2-GAP-Ху1Р были линейаризованы с использованием эндонуклеазы рестрикции *Bgl*III и трансформированы в клетки штамма *P. pastoris* ВКПМ Y-2837 методом электропорации ([http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pich\\_man.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf)). Экспрессионная кассета была встроена в АОХ2 локус.

Трансформанты выращивали при аэрации в среде YPD в течение 20 ч при 30 °С и 250 об/мин. Клетки пересеивали в пробирки со средой YPD в соотношении 1:10, растили в течение 4 сут с аэрацией при 30 °С. Через каждые 24 ч добавляли 2% глюкозы. После окончания ферментации определяли активность фермента в культуральной жидкости. Клон с самой высокой ксиланазной активностью был использован для дальнейших исследований.

### Очистка рекомбинантной ксиланазы

Очистка ксиланазы проводилась с использованием метода гель-хроматографии [37] на колонке Superdex 75-HR. Образцы культуральной жидкости были приготовлены с помощью диализа против буфера (50 мМ трис-НСl, рН 7,0, 0,5 М NaCl) в течение ночи, концентрировали на установке Amicon (Германия) через мембрану с порогом отсеивания 10 кДа и наносили на колонку Superdex 75, уравновешенную при помощи такого же буфера. Фракции, собранные с колонки, анализировали с помощью ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях по методу Лэмли. Количество белка на выходе из колонки измеряли при помощи УФ-детектора при длине волны 280 нм. Фракции, соответствующие пику ксиланазы, отбирали для

дальнейшего анализа. Количество белка определяли по методу Бредфорда, согласно инструкции к реактиву Bradford Reagent В 6916 (Sigma, США).

### Белковый электрофорез

Белковый электрофорез проводили в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии SDS в камере для вертикального электрофореза Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, США) 1 ч при напряжении 50 В, затем 2–3 ч при напряжении 150 В. Окраску белковых гелей осуществляли с использованием набора Pierce Silver Stain Kit (Thermo Scientific, США)

### Анализ ферментативной активности

Определение активности ксиланазы проводили, смешивая 50 мкл 1%-ного раствора субстрата ксилана березы в 0,5 М ацетатном буфере (рН 6) и 50 мкл раствора фермента. Инкубацию проводили при 50 °С в течение 10 мин.

Редуцированные сахара определялись ДНС-методом с использованием глюкозы в качестве стандарта [38].

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

Субстратную специфичность определяли измерением активности с использованием в качестве субстрата ксилана березы (Sigma), арабиноксилана из пшеницы (Megazyme, США), карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) («Химмед») и β-глюкана ячменя (Megazyme).

### Исследование влияния белковых ингибиторов злаков

Ячмень предварительно измельчали до размера частиц 0,5 мм на мельнице «MF 10.1» («IKA», Германия). Для приготовления экстракта использовали 0,1 М ацетатный буфер рН 6 из расчета 100 мл буфера на 20 г измельченного ячменя. Экстракцию проводили в течение 1 ч при 40 °С при перемешивании 140 об/мин в термощейкере TS-100С (Biosan, Латвия). Полученный экстракт центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин.

Эффект устойчивости был изучен 15-минутным инкубированием фермента в присутствии экстракта ячменя при 37 °С с последующим измерением остаточной специфической активности.

### Характеристика рекомбинантного белка Ху11

Оптимальный рН определяли инкубацией очищенного рекомбинантного белка Ху11 с использованием в качестве субстрата ксилана березы в

буферных растворах: 0,5 М глициновый (pH 2–3), 0,5 М ацетатный (pH 4–8), 0,5 М трис (pH 9).

Влияние pH на стабильность Xyl1 оценивали при значениях pH 2–9, используя те же буферные системы.

Температурный оптимум определяли, проводя стандартное исследование активности фермента в диапазоне температур 20–70 °С.

Термостабильность была определена измерением остаточной активности фермента после инкубации при 70, 80, и 90 °С в течение 10 мин. Остаточная активность измерялась по методике, описанной выше.

Влияние ионов металлов и химических реактивов на реакции гидролиза ксилана березы определяли путем измерения активности фермента в буфере с добавлением 1мМ соответствующих реагентов.

Показатели  $K_m$  и  $V_{max}$  рекомбинантного Xyl1 рассчитывали согласно методу двойных обратных величин Лайнуивера–Берка, измеряя активность фермента при 50 °С в 0,5 М ацетатном буфере pH 6 с использованием 0,5–10,0 мг/мл ксилана березы в качестве субстрата.

Эффект устойчивости к протеолитическим ферментам был изучен 15-минутным инкубированием Xyl1 в присутствии 0,1%-ного раствора пепсина при pH 2 и 0,1%-ного раствора трипсина (pH 7) при 37 °С с последующим измерением остаточной активности.

Все измерения производились независимо в трех повторностях ( $P < 0,05$ ).

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве источника гена ксиланазы был использован бактериальный штамм *P. brasiliensis* X1 ВКПМ В-13192. Ксиланазы из *Paenibacillus brasiliensis* ранее исследованы не были, по-

этому в работе использовалась последовательности генов филогенетически близкого вида *Paenibacillus polymyxa*.

Известно, что штаммы вида *P. polymyxa* способны продуцировать не менее пяти различных ферментов, обладающих ксиланолитической активностью [39], поэтому для клонирования гена были использованы вырожденные праймеры, дизайн которых был разработан на основе консервативных участков доступных последовательностей генов различных штаммов *P. polymyxa*, предположительно кодирующих эндо-β-1,4-ксиланазы (EC3.2.1.8).

Методом ПЦР был получен фрагмент ДНК, анализ нуклеотидной последовательности которого показал, что он представляет собой кодирующую область гена *xyl1* размером 639 пн. Продукт трансляции гена – белок Xyl1, состоящий из 212 а.о., с молекулярным весом 23,2 кДа.

Анализ нуклеотидной (*xyl1*) и аминокислотной (Xyl1) последовательностей показал гомологию с последовательностями ксиланаз из *Bacillus licheniformis* (77% нуклеотидной и 82% аминокислотной) [28] и *Bacillus subtilis* (78% нуклеотидной и 83% аминокислотной) [GenBank: KC628735.2]. Аминокислотные последовательности всех трех гомологичных ферментов имели структуры, характерные для гликозилгидролаз семейства GH11 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>).

Анализ аминокислотной последовательности с использованием программы SignalP v. 4.1 позволил определить возможную сигнальную последовательность, которая составила 28 N-концевых аминокислот. Таким образом, была определена последовательность зрелого белка Xyl1 (рис. 1).

Анализ аминокислотной последовательности на основании множественного выравнивания, анализ пространственной структуры, проведенный с использованием информационных ресурсов базы данных NCBI, а также анализ предполагаемой трехмерной модели Xyl1, предсказанной

MFKFSKRMLTVVLAASMSFGVFATTSSAATDYWQ**N**WTDGGGTVNAV**NGSGGNYS**VTWKDTGNF  
VVGKGWTTGSP**N**RTINYNAGVWAPSGNGYLALYGWTRNSLIEYYVVDSWGTYRPTGTYKGTVTS  
DGGTYDIYTTMRYDAPSIEGEKTTFIQYWSVRQSKRPTGG**N**STITFSNHVKAWASKGMNLGS**N**WSY  
QVLATEGYQSSGSS**N**VTW

**Рис. 1.** Аминокислотная последовательность Xyl1. Подчеркивание – возможная сигнальная последовательность; жирным шрифтом выделены возможные сайты N-гликозилирования

**Fig. 1.** The amino acid sequence Xyl1. Underlining indicates a possible signal sequence; bold text, possible sites of N-glycosylation





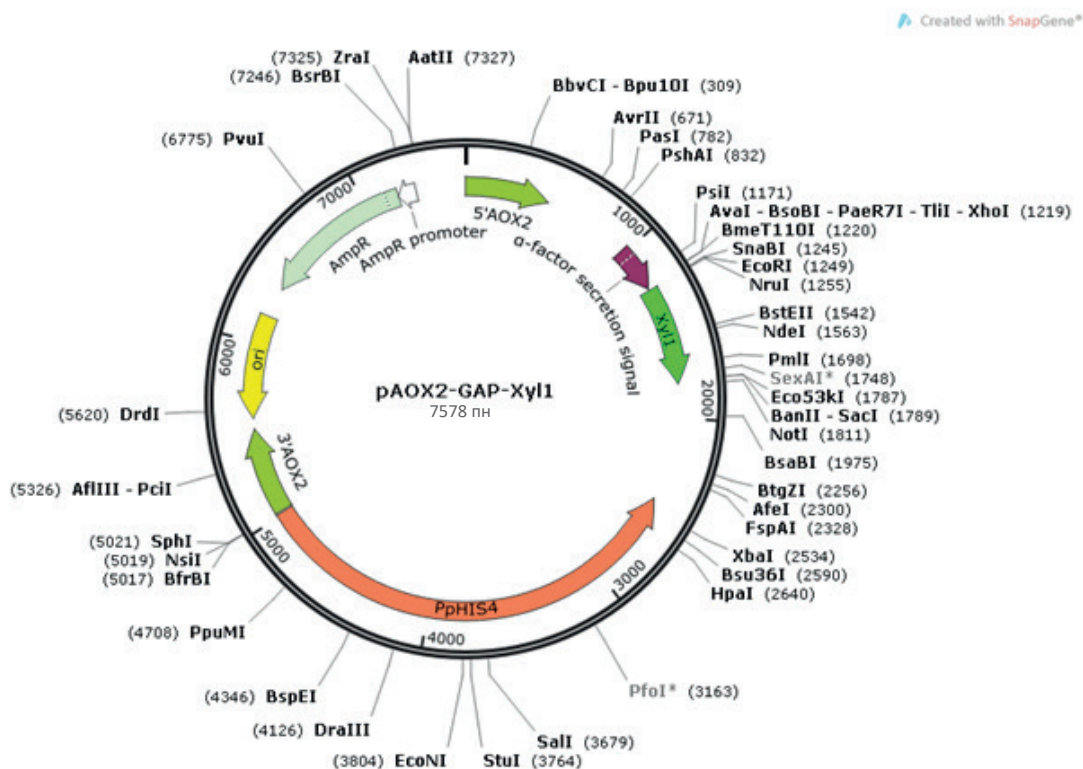


Рис. 3. Физическая карта экспрессионной плазмиды pAOX2-GAP-Xyl1. В скобках – положение сайта на карте плазмиды

Fig. 3. Physical map of the expression plasmid pAOX2-GAP-Xyl1. In brackets – the position of the site on the map

проведенный с использованием программы Net-NGLyc 1.0 Server, в составе белка Xyl1 присутствуют семь сайтов N-гликозилирования Asn-X-Ser/Thr [42].

N-дегликозилирование очищенного белка Xyl1 проводили с использованием фермента эндо-β-N-ацетилглюкозаминидазы H (endo-H). SDS-PAGE-анализ показал, что дегликозилированный белок представлен в виде одной полосы (рис. 4), а его молекулярный вес составляет 28 кДа, что, однако, также больше теоретически рассчитанного значения. Это может быть связано с O-гликозилированием или другими посттрансляционными модификациями.

Очищенный рекомбинантный фермент Xyl1 показал высокую удельную активность (1660 ед/мг белка). По этому показателю исследуемый белок уступает лишь наиболее активным бактериальным ксиланазам из *Paenibacillus campinasensis* (2392 ед/мг белка) [43] и *Bacillus pumilus* (1723 ед/мг белка) [44].

Кинетические параметры фермента были определены в результате проведения гидролитической реакции с использованием ксилана березы в качестве субстрата. Реакции проводились при оптимальных условиях – pH 6 и 50 °C.  $K_m$  и  $V_{max}$  имели значения 1,13 мг/мл и 5124,3 мкмоль/мин·мг, соответственно.

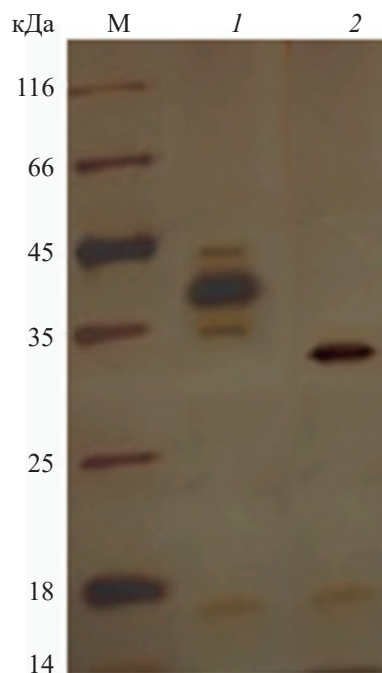


Рис. 4. SDS-PAGE-анализ белка Xyl1. М – белковый маркер молекулярной массы (Thermo Scientific); 1 – очищенный Xyl1; 2 – N-дегликозилированный белок Xyl1

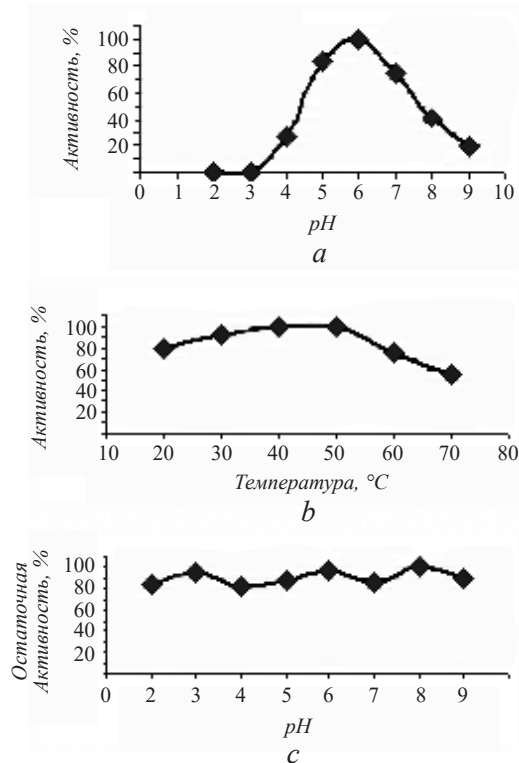
Fig. 4. SDS-PAGE analysis of Xyl1 protein: M, standard protein molecular weight (Thermo Scientific); lane 1, purified Xyl1 protein; lane 2, the N-deglycosylated Xyl1 protein

Характеристики рекомбинантного Xyl1 были исследованы также с использованием ксилана безрезы в качестве субстрата.

Исследования показали, что pH-оптимум рекомбинантной ксиланазы Xyl1 находится в диапазоне 5,7–6,0 (рис. 5a). Фермент был активен в интервале pH от 3 до 9 и сохранял более 50% активности при pH от 4,2 до 7,8. При значениях  $\text{pH} \leq 3$  ферментативной активности не наблюдалось.

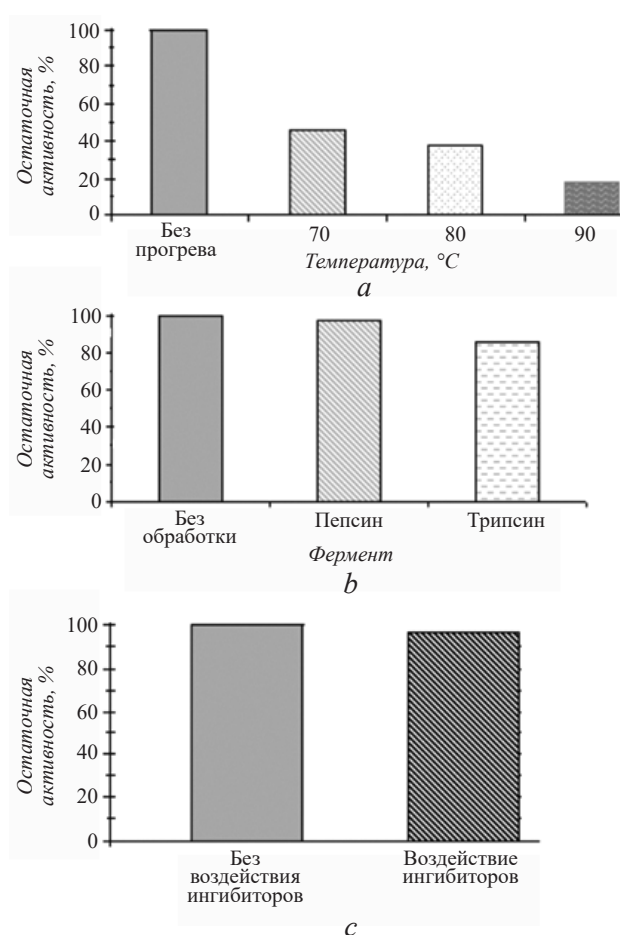
Изучение влияния температуры на активность Xyl1 показало, что температурный оптимум фермента находится в интервале 40–50 °С, при этом в диапазоне температур от 20 до 58 °С активность фермента составляет не менее 80% (рис. 5b).

Эффект pH на активность Xyl1 был изучен инкубированием фермента в буферных растворах с различными значениями pH при 37 °С в течение 30 мин. Фермент был устойчив в широком



**Рис. 5.** pH-оптимум (a) рекомбинантного Xyl1 и влияние температуры (b) и pH (c) на активность Xyl1. Приведены средние значения, полученные в результате проведения трех независимых измерений с учетом погрешности измерения ( $P < 0,05$ )

**Fig. 5.** Characterization of recombinant Xyl1. (a), effects of pH on activity; (b), effects of temperature on activity; (c), pH stability of recombinant Xyl1. The data shown represent the average value obtained as a result of three independent measurements, taking into account the measurement error ( $P < 0,05$ )



**Рис. 6.** Термостабильность Xyl1 (a), устойчивость к пищеварительным ферментам, пепсина и трипсина (b) и белковым ингибиторам ксиланаз злаков (c). Приведены средние значения, полученные в результате проведения трех независимых измерений с учетом погрешности измерения ( $P < 0,05$ )

**Fig. 6.** Study of thermostability, resistance to digestive enzymes and to xylanase protein inhibitors from cereals: (a), thermostability of Xyl1; (b), resistance of Xyl1 to pepsin and trypsin; (c), resistance of Xyl1 to xylanase protein inhibitors from cereals. The data shown represent the average value obtained as a result of three independent measurements, taking into account the measurement error ( $P < 0,05$ )

pH-диапазоне, при этом более 80% активности сохранялось после инкубирования ксиланазы в интервале pH 2–9 (рис. 5c).

Фермент был умеренно устойчив при высоких температурах. Остаточная активность после прогревания Xyl1 при 70, 80 и 90 °С в течение 10 мин составила 46, 38 и 18% соответственно (рис. 6a).

Белок Xyl1 был устойчив к пищеварительным ферментам. После обработки пепсином и трипсином в соответствующем буфере при 37 °С в течение 30 мин остаточная активность фермента составляла 97 и 85%. (рис. 6b).

Рекомбинантный белок Xyl1 подвергали воздействию белковых ингибиторов, содержащихся в экстракте зерен ячменя, с последующим измерением остаточной активности фермента (рис. 6с). Инкубация в присутствии экстракта зерен ячменя привела к уменьшению активности фермента на 4%, что говорит об его высокой устойчивости к белковым ингибиторам ксиланаз злаков.

Была также исследована активность фермента в присутствии ионов металлов и химических реагентов (табл. 1). Влияние ионов  $Mn^{2+}$  и  $Co^{2+}$  приводило к увеличению активности фермента соответственно на 29% и 28,5%. Влияние ЭДТА и SDS приводило к уменьшению активности Xyl1 соответственно на 18,7% и 22%. Добавление других ионов металлов не оказывало существенного влияния на активность фермента.

Специфическая активность очищенного фермента Xyl1 на различных субстратах была измерена при 50 °C и pH 6 в течение 10 мин (табл. 2).

Фермент показал максимальную специфическую активность при использовании ксилана березы в качестве субстрата. Специфическая активность при использовании арабиноксилана была ниже и составила 51,3% от максимального уровня. Также была выявлена способность Xyl1 гидролизовать карбоксиметилцеллюлозу и  $\beta$ -глюкан ячменя.

Такая широкая субстратная специфичность не характерна для эндо- $\beta$ -1,4-ксилаз (EC3.2.1.8) семейства GH11, которые отличаются низкой каталитической универсальностью и расщепляют исключительно внутренние  $\beta$ -1,4-ксилозидные связи в молекуле ксилана [45].

Сравнение аминокислотных последовательностей исследуемого белка и хорошо изученных ксиланаз из *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* позволило выявить замены 29S/K, 97Y/T, 121S/T в составе активного центра ферментов (рис. 2). Возможно, эти аминокислотные замены приводят к изменению в работе фермента Xyl1. Однако данное предположение требует дальнейшего изучения, функции аминокислотных остатков в указанных положениях должны быть в перспективе исследованы с использованием метода сайт-направленного мутагенеза.

Таким образом, были изучены свойства новой высокоактивной эндо- $\beta$ -1,4-ксилазы из *P. brasiliensis* X1 ВКПМ В-13192 в экспрессионной системе *P. pastoris*.

Рекомбинантный белок обладает высокой удельной активностью, кинетическими показателями, характерными для высокоактивного фермента, умеренной термостабильностью,

Таблица 1

**Влияние солей металлов и химических реагентов на активность Xyl1**

**Effects of metal ions and chemical reagents on Xyl1 activity**

Ион металла, химический реагент	Активность, %	Ион металла, химический реагент	Активность, %
Na <sup>+</sup>	91,6	Mn <sup>2+</sup>	129,0
K <sup>+</sup>	98,1	Co <sup>2+</sup>	128,5
Mg <sup>2+</sup>	100,5	Li <sup>+</sup>	103,7
Ca <sup>2+</sup>	113,6	Cu <sup>2+</sup>	106,5
Fe <sup>2+</sup>	100,5	Ni <sup>2+</sup>	100,0
EDTA	81,3	SDS	78,0

Примечание: контроль – 100%.

Таблица 2

**Субстратная специфичность очищенного фермента Xyl1**

**Substrate specificity of the purified Xyl1**

Субстрат	Специфическая активность	
	ед/мг белка	%
Ксилан березы	1660	100
Арабиноксилан	852	51,3
Карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ)	64,7	3,9
$\beta$ -глюкан ячменя	212,5	12,8



устойчивостью к действию пищеварительных ферментов и ингибиторам ксиланаз злаков. Температурный и pH оптимумы исследуемого фермента находятся в интервалах 40–50 °С и 5,7–6,0, соответственно, при этом его активность сохраняется на высоком уровне в широком диапазоне pH и температур. Кроме того, фермент способен эффективно гидролизовать арабиноксилан – основной некрахмальный полисахарид, входящий в состав зерен злаков.

Такие свойства фермента делают его перспективным при создании на его основе дрожжевого рекомбинантного продуцента ксиланазы для использования в кормопроизводстве.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Министерства высшего образования и науки Российской Федерации (Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI60717X0180) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

## ЛИТЕРАТУРА

- Prade R.A. Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotech. Genet. Eng. Rev.*, 1995, 13, 100–131.
- Ebringerova A., Heinze T. Xylan and xylan derivatives – Biopolymers with valuable properties, 1: Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Commun.*, 2000, 21(9), 542–556. doi:10.1002/1521-3927(20000601)21:9<542::AID-MARC542>3.0.CO;2-7
- Coughlan M.P., Hazlewood G.P.  $\beta$ -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems, biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1993, 5(17), 259–289.
- Subramaniyan S., Prema P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2002, 22, 33–64.
- Bhat M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotech. Adv.*, 2000, 18, 355–383. doi: 10.1080/07388550290789450
- Galante Y.M., De Conti A., Monteverdi R. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries In: *Trichoderma and Gliocladium – Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*. London, Great Britain. Taylor and Francis, 1998, 327–342.
- Wong K.K.Y., Saddler J.N. Applications of hemicellulases in the food, feed and pulp and paper industries In: *Hemicelluloses and Hemicellulases*. London, Great Britain. Portland Press, 1993, 127–143.
- Dutron A., Georis J., Genot B., et al. Use of family 8 enzymes with xylanolytic activity in baking. WO 2004/023879 A1, 2004.
- Maat J., Roza M., Verbakel J., et al. Xylanases and their application in baking In: *Xylan and Xylanases*. Amsterdam, Holland. Elsevier, 1992, 349–360.
- Mathlouthi N., Lalles J.P., Lepercq P., et al. Xylanase and beta-glucanase supplementation improve conjugated bile acid fraction in intestinal contents and increase villus size of small intestine wall in broiler chickens fed a rye-based diet. *J. Anim. Sci.*, 2002, 80, 2773–2779.
- Mathlouthi N., Mohamed M.A., Larbier M. Effect of enzyme preparation containing xylanase and betaglucanase on performance of laying hens fed wheat/barley or maize/soybean meal-based diets. *Br. Poult. Sci.*, 2003, 44, 60–66. doi: 10.1080/0007166031000085374
- Mathlouthi N., Juin H., Larbier M. Effect of xylanase and beta-glucanase supplementation of wheat- or wheat- and barley-based diets on the performance of male turkeys. *Br. Poult. Sci.*, 2003, 44, 291–298. doi: 10.1080/0007166031000096498
- Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 56, 326–338.
- Viikari L. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1994, 13, 335–350.
- Pala H., Mota M., Gama F.M. Enzymatic versus chemical deinking of non-impact ink printed paper. *J. Biotechnol.*, 2004, 108, 79–89.
- Frederix S.A., Courtin C.M., Delcour J.A. Impact of xylanases with different substrate selectivity on gluten-starch separation of wheat. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 3(5), 7338–7345. doi: 10.1021/jf0345393
- Guex N., Peitsch M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 1997, 18, 2714–2723.
- Prade R.A. Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotech. Genet. Eng. Rev.*, 1995, 13, 100–131.
- Mielenz J.R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2001, 4, 324–329.
- Saha B.C. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, 30, 279–291. doi: 10.1007/s10295-003-0049-x
- Collins T., Gerday C., Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Rev.*, 2005, 29, 3–23. doi: 10.1016/j.femsre.2004.06.005
- Sugumaran K.R., Kumar B.K., Mahalakshmi M., Ponanusami V. Cassava bagasse – Low cost substrate for thermotolerant xylanase production using *Bacillus subtilis*. *J. Chem. Tech. Res.*, 2013, 5, 394–400.
- Huang J., Wang G., Xiao L. Cloning, sequencing and expression of the xylanase gene from a *Bacillus subtilis* strain B10 in *Escherichia coli*. *Biores. Technol.*, 2006, 97, 802–808. doi: 10.1016/j.biortech.2005.04.011

24. Subramaniam S. Isolation, purification and characterization of low molecular weight xylanase from *Bacillus pumilus* SSP-34. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2012, 166, 183–1842. doi: 10.1007/s12010-012-9600-4
25. Battan B., Sharma J., Dhiman S.S., Kuhad R.C. Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enz. Microb. Technol.*, 2007, 41, 733–739. doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.06.006
26. Harris A. D., Ramalingam C. Production of xylanase from watermelon rind by *Bacillus weihenstephanesis* strain ANR1. *J. Chem. Tech. Res.*, 2015, 8, 1–5.
27. Mamo G., Delgado O., Martinez A., et al. Cloning, sequence analysis, and expression of a gene encoding an endoxylanase from *Bacillus halodurans* S7. *Mol. Biotechnol.*, 2006, 33, 149–159. doi: 10.1385/MB:33:2:149
28. Lee C.C., Kibblewhite-Accinelli R.E., Smith M.R., et al. Cloning of *Bacillus licheniformis* xylanase gene and characterization of recombinant enzyme. *Curr. Microbiol.*, 2008, 57, 301–305. doi: 10.1007/s00284-008-9193-x
29. Maha T.H., Emam L., et al. Cloning, sequencing and expression of the xylanase gene from *Bacillus pumilus* GH in *Escherichia coli*. *J. Chem. Tech. Res.*, 2016, 9(12), 114–124.
30. Sung W.L., Luk C.K., Zahab D.M. Overexpression and purification of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* xylanases in *Escherichia coli*. *Pro. Express. Purif.*, 1993, 4, 200–206.
31. Goswami G.K., Krishnamohan M., Nain V., et al. Cloning and heterologous expression of cellulase free thermostable xylanase from *Bacillus brevis*. *Springer Plus.*, 2014, 3, 20–25. doi: 10.1186/2193-1801-3-20
32. Ghio S., Insani E. M., Piccinni F. E., et al. GH10 Xyn A is the main xylanase identified in the crude enzymatic extract of *Paenibacillus* sp. A59 when grown on xylan or lignocellulosic biomass. *Microbiol. Res.*, 2016, 186, 16–26. doi: 10.1016/j.micres.2016.02.006
33. Ko C.H., Tsaia C.H., Tu J., et al. Molecular cloning and characterization of a novel thermostable xylanase from *Paenibacillus campinasensis* BL11. *Proc. Biochem.*, 2010, 45, 1638–1644. doi: 10.1016/j.procbio.2010.06.015
34. Hwang I.T., Lim H.K., Song H.Y., et al. Cloning and characterization of a xylanase KRICT PX1 from the strain *Paenibacillus* sp. HPL-001. *Biotechnol. Adv.*, 2010, 28, 594–601. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.05.007
35. Lee H. J., Shin D. J., Cho N. C., et al. Cloning, expression and nucleotide sequences of two xylanase genes from *Paenibacillus* sp. *Biotech. Lett.*, 2000, 22, 387–392.
36. Калинина А. Н. и др. Скрининг и таксономическая характеристика бактериальных продуцентов ксиланаз. *Биотехнология.*, 2017, 33 (6), 37–41.
37. Юркевич В.В. Малый практикум по биохимии. Москва, СССР. Издательство МГУ, 1979, 159–175.
38. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 1959, 31(3), 426–428.
39. Piñaga F., Peña J.L., Vallés S. Xylanase production by *Bacillus polymyxa*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1993, 57(4), 327–333.
40. Murakami M.T., Arni R.K., Vieira D.S., et al. Correlation of temperature induced conformation change with optimum catalytic activity in the recombinant G/11 xylanase A from *Bacillus subtilis* strain 168 (1A1). *Febs Lett.*, 2005, 579, 6505–6510. doi: 10.1016/j.febslet.2005.10.039
41. Torronen A., Rouvinen J. Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4-beta-xylanases. *J. Biotechnol.*, 1997, 57, 137–149.
42. Cereghino J.L., Cregg J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2000, 24, 45–66.
43. Ko C., Tsai C., Tu J., et al. Molecular cloning and characterization of a novel thermostable xylanase from *Paenibacillus campinasensis* BL11. *Process Biochem.*, 2010, 45, 1638–1644. doi: 10.1016/j.procbio.2010.06.015
44. Subramaniam S. Isolation, purification and characterization of low molecular weight xylanase from *Bacillus pumilus* SSP-34. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2012, 166, 1831–1842. doi: 10.1007/s12010-012-9600-4
45. Biely P., Vrsanska M., Tenkanen M., Kluepfel D. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.*, 1997, 57, 151–166.

## Expression of Gene for Xylanase from *Paenibacillus brasilensis* X1 in *Pichia pastoris* and Characteristics of Recombinant Enzyme

A.N. KALININA<sup>1,\*</sup>, T.L. GORDEEVA<sup>1</sup>, and S.P. SINEOKY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center “Kurchatov Institute” (NRC “Kurchatov Institute” – GOSNIIGENETIKA), 117545, Moscow Russia

\*e-mail: anna.kalininaa@yandex.ru

Received October 12, 2018

Revised November 10.2018

Accepted December 15, 2018

**Abstract**—The heterologous expression, isolation and characterization of a novel xylanase from *Paenibacillus brasilensis* have been described. The *xyl1* gene from the *Paenibacillus brasilensis* X1 VKPM B-13092 strain consisting of 639 nucleotides encodes the secreted endo-1,4- $\beta$ -xylanase (EC 3.2.1.8) that contains 184 amino acids and 28 residues of the putative signal peptide in the N-terminal region. The nucleotide sequence of the *xyl1* gene and the amino acid sequence of the mature Xyl1 protein have the greatest homology with the *Bacillus subtilis* endo-1,4- $\beta$ -xylanase sequences (78% and 83%, respectively). A gene fragment encoding the mature protein was expressed in *Pichia pastoris*. The purified recombinant Xyl1 enzyme was capable of using birch xylan and arabinoxylan as substrates. When birch xylan was used, the optimum pH of the enzymatic reaction was 6.0, optimum temperature was 40–50° C, and  $K_m$  and  $V_{max}$ , were equal to 1.1288 mg/mL and 5124.3  $\mu$ mol/(min·mg), respectively. The recombinant Xyl1 protein showed high pH and thermal stability, resistance to digestive enzymes and xylanase protein inhibitors from cereals. It was also shown that  $Mn^{2+}$  and  $Co^{2+}$  ions stimulate the enzyme activity.

**Key words:** xylanase, xylan, *Paenibacillus brasilensis*, *Pichia pastoris*.

**Acknowledgment** – The work was financially supported by the Ministry of Education and Science of RF (the Unique Project Identifier RFMEFI60717X0180) using the Multipurpose Scientific Installation of National Bioresource Center All-Russian Collection of Industrial Microorganisms, NRC «Kurchatov Institute»– GOSNIIGENETIKA.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-6-22-32