

УДК 579

Скрининг и таксономическая характеристика бактериальных продуцентов ксиланаз

© 2017 А.Н. КАЛИНИНА*, Л.Н. БОРЩЕВСКАЯ, Т.Л. ГОРДЕЕВА, С.П. СИНЕОКИЙ

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» Национального исследовательского центра «Курчатовский Институт» (НИЦ «Курчатовский Институт» – ГосНИИГенетика), Москва, 117545

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

Поступила: 27.10.2017 г.

Принята в печать: 13.11.2017 г.

Проведены ступенчатый скрининг бактериальных штаммов – продуцентов ксиланаз, выделенных из образцов лесной почвы Московской области, а также их таксономическая идентификация, основанная на анализе последовательности генов, кодирующих 16S рРНК. Предложен подход к селекции наиболее активных продуцентов ферментов, и отобраны четыре штамма – продуцента ксиланаз. Следует отметить, что виды (*Paenibacillus jamilae* и *P. brasilensis*), к которым принадлежат два из отобранных штаммов, впервые описаны в настоящей работе как продуценты ксиланолитических ферментов и свойства ферментов, секретируемых представителями этих видов, до сих пор не были изучены. Новые штаммы могут быть использованы в качестве источников генов для конструирования высокоактивных продуцентов ксиланаз.

Ключевые слова: скрининг, ксиланазы, конго красный, молекулярно-биологическая идентификация.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-37-41

Ксилан – второй по распространенности природный полимер после целлюлозы – встречается практически во всех растительных тканях [1]. В зависимости от происхождения структура и химический состав ксилана значительно меняются, но в любом случае главная цепь полимера состоит из β-1,4-связанных остатков D-ксилозы, которые частично ацетилированы и имеют в боковых цепях заместители в виде остатков D-глюкуроновой кислоты, α-L-арабинозы, а также феруловой и п-кумаровой кислот [2, 3].

Во многих технологических процессах, прежде всего при производстве бумаги и целлюлозы, ксилан является нежелательной примесью, в связи с чем возникает проблема его удаления. Гидролиз ксилана является также необходимой стадией некоторых процессов в пищевой, кормовой промышленности и при комплексной переработке растительных отходов.

Гидролиз ксилана осуществляется с помощью химических реагентов или ферментативным путем с использованием ксиланаз. Ферментативный гидролиз является предпочтительным, так как он оказывает меньшее воздействие на структуру дру-

гих растительных волокон и не приводит к образованию большого количества отходов. В пищевой или кормовой промышленности химический гидролиз вообще не приемлем.

Ксиланазы представляют собой комплекс ферментов, которые разрушают гетерогенный ксилан. Главным из них является фермент эндо-1,4-ксиланазы (КФ 3.2.1.8), который катализирует распад ксилана до ксилоолигосахаридов. Другие ферменты, такие как ксилозидаза, L-арабинофуразидаза, глюкуронидаза и эстераза (ксиланацетиластераза и ферилоиластераза), осуществляют полный гидролиз ксилоолигосахаридов до мономеров.

Ксиланазы широко применяются в целлюлозно-бумажной промышленности, в процессах отбеливания целлюлозы, в животноводстве как компоненты комбикормов, в хлебопечении [1, 2, 4]. Основными источниками ксиланаз являются микроорганизмы – бактерии, археи, грибы и дрожжи [1–3, 5, 6]. Ксиланазы из различных источников имеют не только разную активность, но и несхожие условия оптимального функционирования и, соответственно, сферы применения.

Список сокращений: среда LB – среда Лурия–Бертани.

Большинство коммерческих ферментных препаратов ксиланаз производится на основе ферментов из традиционных источников – грибов продуцентов р. *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium* и *Talaromyces*. Однако ферментные препараты из грибов, как правило, обладают также целлюлазной активностью и низким рН-оптимумом, что не позволяет использовать их в таких сферах, как целлюлозно-бумажное производство.

Бактериальные ксиланазы обычно являются термостабильными и щелочеустойчивыми, что определяет их использование в процессах переработки сельскохозяйственного сырья.

В настоящее время актуальной является задача создания ферментных препаратов на основе ксиланаз, обладающих высокими термостабильностью и удельной активностью, а также устойчивостью по отношению к белковым ингибиторам ферментов зерна злаков, что особенно важно при использовании ксиланаз в качестве компонентов комбикормов [7, 8].

Поиск новых ксиланолитических ферментов и исследование их свойств является актуальной задачей. Для решения этой задачи постоянно ведется поиск новых штаммов – продуцентов ксиланаз, вызванный потребностью в ферментах с улучшенными свойствами и желанием расширить спектр существующих продуцентов.

Целью данной работы был скрининг почвенных бактериальных штаммов-продуцентов секретируемых ксиланаз, а также их генетическая идентификация.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Скрининг штаммов, способных к утилизации ксиланаз

Для выделения бактериальных штаммов-продуцентов ксиланаз анализировали образцы почв лесной зоны Московской области. Навеску почвы в количестве 10 г переносили в колбу со 100 мл стерильного физиологического раствора («Биохимик», Россия) и перемешивали на качалке при 250 об/мин в течение 30 мин. Полученную суспензию использовали для приготовления 10-кратных разведений.

Для получения изолированных колоний образцы высевали на минимальную агаризованную питательную среду следующего состава, %: NaNO_3 – 0,1; K_2HPO_4 – 0,1; MgSO_4 – 0,05; KCl – 0,1 (производитель солей – «Химмед», Россия); дрожжевой экстракт – 0,05 (BASF, Германия); ксилан березы

(Sigma, США) – 1 и агар – 1,5 % (Panreac, Испания). В среду добавляли также нистатин («Биосинтез», Россия) в концентрации 50 ед/мл для подавления грибной и дрожжевой микрофлоры.

Суспензию почвы в количестве 100 мкл стерильно переносили на агаризованную среду, используя метод посева по Дригальскому. Культивирование осуществляли при 28 °С в течение 48 ч, после чего проводили учет выросших колоний. Изолированные колонии бактерий переносили на свежую среду LB.

Отбор продуцентов, наиболее активно секретирующих ксиланазы

Бактериальные колонии, способные к росту на ксилане как единственном источнике углерода, высевали на агаризованную среду следующего состава, %: пептон (Panreac) – 1; дрожжевой экстракт – 0,5; NaCl («Химмед») – 0,5; ксилан березы – 1.

Культивирование проводили при 28 °С в течение 48 ч, после чего поверхность агара покрывали 0,2%-ным раствором конго красного, инкубировали в течение 15 мин и затем дважды промывали 1 М раствором NaCl . После этого поверхность агара покрывали 0,1 М раствором лимонной кислоты, инкубировали 5 мин и дважды промывали водой.

Визуализацию зон гидролиза ксилана проводили в проходящем свете.

Идентификация отобранных бактериальных штаммов

Хромосомную ДНК из биомассы исследуемых бактериальных штаммов выделяли с использованием набора реагентов S-Сорб («Синтол», Россия).

Аmplификацию генов, кодирующих рРНК, проводили с использованием консервативных праймеров:

8f – agagtttgatcctgctcag;
926r – ccgtcaattccttragtt;
1492r – ggttacctgttacgact.

Для ПЦР использовали следующий режим: 95 °С – 3 мин; затем 35 циклов (95 °С – 30 с, 57 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин 30 с); затем 72 °С – 5 мин.

Секвенирование осуществляли на автоматическом приборе AE3000 (Applied Biosystems, США).

Для анализа последовательностей использовали специализированную филогенетическую компьютерную программу Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu>).

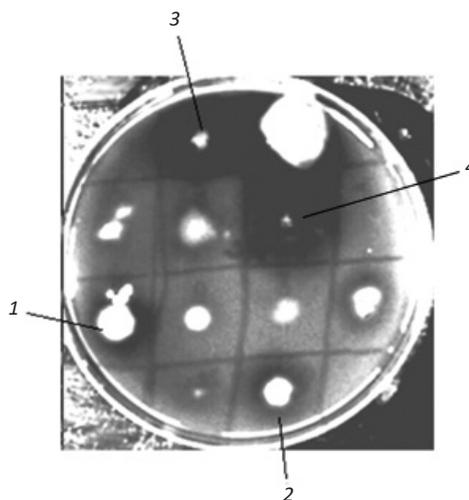
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе из образцов почв лесной зоны Московской области были выделены штаммы, способные к утилизации ксилана. Для этого использовали минимальную среду с добавлением ксилана в качестве единственного источника углерода. Рост грибных и дрожжевых штаммов, присутствующих в почве, подавляли нистатином. В результате данного этапа работы были отобраны 11 колоний, которые были перенесены на полную среду для получения чистых бактериальных культур.

На втором этапе скрининга изолированные бактериальные штаммы были протестированы для выявления наиболее активных продуцентов секретируемых ксиланаз. Активность внеклеточного фермента приводит к гидролизу ксилана, входящего в состав агаризованной питательной среды. Чем выше продукция фермента или чем он активнее, тем выше степень гидролиза субстрата и тем более выражены после окрашивания зоны осветления, или ореолы, вокруг выросших колоний, которые оценивали визуально.

Как правило, для визуализации зон осветления используют такие красители как иод [9, 10] или конго красный [9, 11, 12]. Было показано [13], что использование конго красного предпочтительно для выявления продуцентов карбогидролитических ферментов, в частности ксиланаз, так как при нем удается избежать появления ложных ореолов, что часто отмечается при окрашивании иодом.

Бактериальные штаммы, отобранные на первом этапе скрининга, были посеяны на агаризованную среду с добавлением 1%-ного ксилана. Чашки инкубировали при 28 °С в течении 48 ч, после чего агаровую поверхность покрывали 0,2%-ным раствором конго красного, промывали 1 М NaCl и проводили визуализацию зон осветления на белом фоне. Процедура визуализации была затруднена из-за низкой контрастности и нечеткости границ зон осветления, что могло привести к ошибкам в отборе лучших продуцентов фермента. Чтобы избежать недостоверных результатов, мы воспользовались свойством красителя менять цвет в зависимости от значения pH. Известно, что при значениях pH > 5 конго красный имеет красную окраску, а при pH < 5 – синюю или черную. Для увеличения контрастности зон гидролиза ксилана чашки после отмывания от красителя покрывали 0,1 М раствором лимонной кислоты. В результате этого связанный с агаром конго красный изменял цвет на синий и зоны гидролиза ксилана обозначались более четко (рисунок).



Визуализация зон гидролиза ксилана (более темные участки вокруг светлых колоний бактерий) с использованием конго красного и лимонной кислоты: 1–4 – штаммы, отобранные для дальнейших исследований

Visualization of zones of xylane hydrolysis (darker areas around light bacteria colonies) by staining with Congo red and addition of citric acid: 1–4, strains that were selected for further investigation

Как видно из рисунка, исследуемые штаммы существенно различались по величине и интенсивности зон окрашивания вокруг колоний и, соответственно, степени гидролиза ксилана.

В результате данного этапа работы были отобраны 4 штамма, для которых была зафиксирована максимальная площадь зоны окрашивания (на рисунке – более темная область вокруг колоний).

На третьем этапе работы была проведена молекулярно-генетическая идентификация четырех отобранных штаммов – продуцентов ксиланаз – на основе анализа нуклеотидной последовательности генов, кодирующих 16S рРНК. Методом ПЦР с использованием в качестве матрицы хромосомной ДНК отобранных штаммов эти гены были амплифицированы. Фрагменты ДНК были секвенированы, после чего был проведен анализ их нуклеотидной последовательности с использованием специализированной программы Ribosomal database project.

В результате было обнаружено, что четыре выделенные штамма принадлежат к четырем различным видам (таблица).

Ксиланазы *Bacillus subtilis* и *B. licheniformis* были ранее описаны, и некоторые их свойства были изучены [14, 15]. В то же время, литературные данные не содержат упоминания о видах *Paenibacillus jamilae* и *P. brasilensis* в качестве

Идентификации штаммов-продуцентов ксиланаз по последовательности 16S рРНК**Identification of xylanase-producing strains by 16S rRNA sequencing**

Номер штамма	Род, вид
1	<i>Bacillus subtilis</i>
2	<i>B. licheniformis</i>
3	<i>Paenibacillus jamilae</i>
4	<i>P. brasiliensis</i>

продуцентов ксиланаз. Изучение свойств ферментов, секретируемых этими штаммами, будет являться задачей наших дальнейших исследований.

Итак, для поиска новых бактериальных штаммов-продуцентов ксиланаз был использован ступенчатый скрининг, состоящий из трех этапов: на первом этапе был осуществлен отбор бактериальных штаммов, способных к росту на ксилане как единственном источнике углерода; на втором с использованием диагностических сред и чашечного теста были отобраны штаммы, секретирующие наиболее активные ксиланазы; на третьем этапе была проведена молекулярно-генетическая идентификация наиболее эффективных продуцентов ксиланаз на основе анализа последовательности генов, кодирующих 16S рРНК.

В ходе данной работы впервые описана способность бактерий видов *Paenibacillus jamilae* и *P. brasiliensis* продуцировать ферменты класса ксиланаз.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта - RFMEFI60717X0180) и с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов».

ЛИТЕРАТУРА

- Prade R.A. Xylanases: from Biology to BioTechnology. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 1996, 13(1), 101–132. doi: 10.1080/02648725.1996.10647925
- Kulkarni N., Shendye A., Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1999, 23(4), 411–456. doi: 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407x
- Liab K., Azadi P., Collins R., et al. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, 27(1), 89–94. doi: 10.1016/S0141-0229(00)00190-3
- Manji A.H. Extended usage of xylanase enzyme to enhance the bleaching of softwood kraft pulp. *Tappi J.*, 2006, 5(1), 23–26.
- Coughlan M.P., Hazlewood G.P. Hemicellulose and Hemicellulases. London-Chapel Hill: Portland Press, 1993, 1–27.
- Collins T., Gerday C., Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, 29(1), 3–23. doi: 10.1016/j.femsre.2004.06.005
- Гусаков А.В. Белковые ингибиторы микробных ксиланаз. *Биохимия*, 2010, 75(10), 1331–1347.
- Denisenko Y.A., Merzlov D.A., Gusakov A.V., et al. Comparative characterization of xylanases XylA and XylE from *Penicillium canescens* fungi. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2015, 70(6), 278–282.
- Andro T., Chambost J.P., Kotoujansky A., et al. Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. *J Bacteriol.*, 1984; 160, 1199–1203.
- Yoon J.H., Park J.E., Suh D.Y., et al. Comparison of dyes for easy detection of extracellular cellulases in fungi. *Mycobiology*, 2007, 35(1), 21–24. doi: 10.4489/MYCO.2007.35.1.021
- Kasana R.C., Salwan R., Dhar H., et al. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Curr. Microbiol.*, 2008, 57, 503–507. doi: 10.1007/s00284-008-9276-8
- Teather R.M., Wood P.J. Use of Congo red polysaccharide interactions complex formation between Congo red and polysaccharide in detection and assay of polysaccharide hydrolases. *Methods Enzymol.*, 1982, 160, 59–74.
- Meddeb-Mouelhi F., Moisan J.K., Beauregard M. A comparison of plate assay methods for detecting extracellular cellulase and xylanase activity. *Enzyme Microbial Technology*, 2014, 66, 16–19. doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.07.004
- 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(4), 301–305. doi: 10.1007/s00284-008-9193-x
- Jalal A., Rashid N., Rasool N., Akhtar M. Gene cloning and characterization of a xylanase from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain R5. *J. Biosci. Bioeng.*, 2009, 107(4), 360–365. doi: 10.1016/j.jbiosc.2008.12.005

Screening and Taxonomic Characterization of Xylanase Bacterial Producers

A.N. KALININA*, L.N. BORSHCHEVSKAYA, T.L. GORDEEVA, and S.P. SINEOKY

The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Centre «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» – GosNIIgenetika), 117545, Moscow Russia

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

Received October 27, 2017

Accepted November 13, 2017

Abstract—A stepwise screening of bacterial producers of xylanases isolated from the forest soil in Moscow oblast, and also the taxonomic identification of the microorganisms based on the analysis of the 16S RNA gene sequences have been performed. An approach to the selection of the most active producers was suggested, and this selection was carried out resulting in 4 producing strains. Interestingly, the species to which 2 of the selected strains (*Paenibacillus jamilae* and *P. brasilensis*) belong were described as producers of xylanolytic enzymes for the first time, and the characteristics of those xylanases have not yet been studied. The new strains can serve as a source of genes for the construction of high-efficient xylanase producers.

Key words: screening, xylanases, Congo red, molecular biological identification.

Acknowledgements— The work was financially supported by the Ministry of Education and Science of RF (Project Unique Identifier RFMEFI60717X0180) and used the help of the National Bioresource Center *All-Russian Collection of Industrial Microorganisms* (Moscow, Russia).

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-37-41