

УДК 579.66

Сравнение ксиланаз различного происхождения в экспрессионной системе *Pichia pastoris*: экспрессия, биохимическая характеристика и биотехнологический потенциал

© 2018 А.Н. КАЛИНИНА¹, Л.Н. БОРЩЕВСКАЯ^{1,*}, Т.Л. ГОРДЕЕВА¹, С.П. СИНЕОКИЙ¹

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

*e-mail: larisa.larbor3@yandex.ru

Поступила: 25.05.2018 г.

Принята в печать: 06.07.2018 г.

В экспрессионной системе *Pichia pastoris* получены эндо-1,4-β-ксилаза из *Bacillus pumilus* ВКПМ В-7975, *Paenibacillus polymyxa* ВКПМ В-3015, *Thermomyces lanuginosus* ВКПМ F-224 и *Schizophyllum commune* ВКПМ F-433, принадлежащие к семейству 11 гликогидролаз. Были исследованы такие технологически значимые характеристики рекомбинантных ксиланаз, как удельная активность, рН- и термостабильность, температурный и рН оптимумы, устойчивость к пищеварительным ферментам и белковым ингибиторам ксиланаз злаков, субстратная специфичность. Было показано, что для создания продуцента ксиланаз на основе рекомбинантных штаммов дрожжей *Pichia pastoris* с целью использования его в кормопроизводстве наибольшим биотехнологическим потенциалом обладает фермент из *Paenibacillus polymyxa*.

Ключевые слова: кормовые ферменты, ксилан, ксиланаза, *Pichia pastoris*.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-4-26-36

Ксилан – основной представитель гемицеллюлоз в зерне и твердой древесине. Он является вторым по распространенности после целлюлозы возобновляемым полисахаридом в природе. Это комплексный полисахарид, основная цепь которого состоит из β-(1-4)-связанного ксилозного скелета с небольшим количеством β-(1-3)-ответвлений [1]. В зависимости от вида растения, из которого получен ксилан, в состав его побочной цепи могут быть включены ацетильные, арабинозные, глюкуроновые, метил-глюкуроновые остатки. Ксилан из большинства растительных источников существует в виде гетерополисахарида, в котором к С-2 атомам ксилозы присоединены 4-О-метильные α-D-глюкуроновые остатки [2].

Степень полимеризации ксиланов различного происхождения варьирует в пределах 70–200 остатков [3]. Ксилан, выделенный из

твердой древесины, имеет высокую степень ацетилирования (70%) по С 2 и С 3 атомам ксилозы, в то время как в ксилане из мягкой древесины ацетилирование отсутствует [4]. Ксилан травянистых растений обычно обозначают как арабиноксилан, в связи с большим содержанием остатков арабинозы, которые присоединены к С 2 и С 3 атомы ксилозы.

Ксилан как источник углерода может использоваться многими бактериями и грибами. Для гидролиза ксилана микроорганизмы продуцируют несколько ферментов. Основную роль в разрушении ксилана играет ксиланаза (эндо-1,4-β-ксилаза, КФ 3.2.1.8), которая катализирует случайный гидролиз ксилана до ксилололигосахаридов. Завершает процесс разложения фермент β-ксилозидаза (ксилан-1,4-β-ксилозидаза, КФ 3.2.1.37) путем высвобождения остатков ксилозы из

Список сокращений: КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; GH11 – семейство 11 гликогидролаз; SDS – лаурилсульфат натрия; SDS-PAGE – белковый электрофорез в денатурирующих условиях, которые достигаются добавлением SDS

нередуцирующих концов ксилололигосахаридов. Боковые цепи и ацильные группы ксилана расщепляются двумя ферментами: глюкуро니다зой (α -глюкозидуроной, КФ 3.2.1.139) и ацетилксилаанэстеразой (КФ 3.1.1.72) [5].

Ксиланазы активно используются на практике для улучшения свойств кормов животных, в хлебопекарной, текстильной и целлюлозобумажной промышленности [6, 7].

Свойства ксиланаз различного происхождения существенно различаются, что необходимо учитывать при создании на их основе ферментных препаратов для определенных отраслей промышленности.

Традиционно ферментные препараты, в состав которых входят ксиланазы, получают на основе нерекombинантных и рекомбинантных штаммов грибов рода *Trichoderma*, *Aspergillus* и *Penicillium*. Однако грибные штаммы, помимо ксиланазы, продуцирует ряд других карбогидраз, а именно целлюлазу, глюканазу, пектиназу и манназу, что не позволяет использовать их при производстве моноферментных препаратов.

Сегодня наиболее перспективным является создание продуцентов ферментов на основе рекомбинантных штаммов метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. Культуры дрожжей *Pichia pastoris* способны расти до очень высоких плотностей с использованием несбраживаемых источников углерода – глицерина, метанола, что позволяет получать высокие концентрации гетерологичного белка [8]. При этом процесс культивирования метилотрофных дрожжей достаточно прост, поскольку их рост не блокируется продуктами метаболизма [9].

Однако белки, в том числе и ферменты, синтезируемые в клетках в *Pichia pastoris*, подвергаются посттрансляционным модификациям, к которым относятся различные виды гликозилирования, что может приводить к существенному изменению их свойств по сравнению со свойствами нативных белков. Кроме того, эффективность экспрессии белков различного происхождения в клетках метилотрофных дрожжей может быть различной. Эти аспекты необходимо учитывать на стадии планирования работ по созданию рекомбинантных штаммов-продуцентов.

Цель нашей работы – исследование и сравнение свойств ксиланаз различного происхождения в экспрессионной системе *P. pastoris* для последующего выбора фермента, обладающего характеристиками, оптимальными для использования

в кормопроизводстве и перспективного для конструирования на его основе дрожжевого рекомбинантного продуцента.

Из литературных источников известно, что ксиланазы различного происхождения в экспрессионной системе *Pichia pastoris* являются секретруемыми эндо-1,4- β -ксилааназы (ЕС 3.2.1.8), относящимися к семейству GH11. Бактериальные и грибные ксиланазы изучались ранее и были охарактеризованы некоторые их свойства [11–17], однако, сравнение свойств этих ферментов в одной экспрессионной системе никогда не проводилось. Кроме того, ксиланазы из *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus polymyxa*, *Thermomyces lanuginosus* в дрожжевой системе метилотрофных дрожжей *P. pastoris* ранее экспрессированы не были.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Микроорганизмы, питательные среды, плазмиды

В качестве источников генов, кодирующих ксиланазы, были использованы следующие штаммы из коллекции БРЦ ВКПМ: *Bacillus pumilus* ВКПМ В-7975, *Paenibacillus polymyxa* ВКПМ В-3015, *Thermomyces lanuginosus* ВКПМ F-224, *Schizophyllum commune* ВКПМ F-433.

Для клонирования был использован штамм *Escherichia coli* XL1 Blue (*endA1 supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac hsdR17 F'[proAB lacIqZ Δ M15 Tn10]*) ВКПМ В-9838.

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

Для культивирования *Escherichia coli* XL1 Blue была использована LB-среда: 5%-ный дрожжевой экстракт («Диа-М», Россия), 1%-ный триптон («Диа-М»), 1% NaCl («Химмед», Россия). Для роста и экспрессии белков в *P. pastoris* была использована YPD-среда: 1%-ный дрожжевой экстракт («Диа-М»), 1,5%-ный триптон («Диа-М»), 2%-ная глюкоза («Химмед»).

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Нуклеотидные последовательности анализировали с использованием программы NCBI ORF Finder tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Для поиска возможных сигнальных последовательностей применялась программа SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Поиск сайтов N-гликозилирования осуществлялся с помощью программы NetNGlyc 1.0 Server.

Конструирование рекомбинантных экспрессионных плазмид

Суммарную ДНК штаммов *Bacillus pumilus* ВКПМ В-7975 и *Paenibacillus polymyxa* ВКПМ В-3015 выделяли, используя набор для выделения ДНК S-Сорб («Синтол», Россия).

Суммарную кДНК штаммов *Thermomyces lanuginosus* ВКПМ F-224 и *Schizophyllum commune* ВКПМ F-433 получали с использованием набора для выделения РНК Проба-НК («ДНК-технология», Россия).

Для амплификации генов ксиланаз использовали праймеры, приведенные в табл. 1.

Аmplificи́рованные продукты, кодирующие зрелые ферменты ксиланазы, были клонированы в состав вектора рАОХ2-GAP, в результате чего были получены рекомбинантные плазмиды рАОХ2-GAP-XylPum, рАОХ2-GAP-XylPaen, рАОХ2-GAP-XylTherm, рАОХ2-GAP-XylSch. Последовательности, кодирующие ксиланазы, были встроены в рамку считывания с сигнальной последовательностью вектора.

Получение трансформантов и ферментация отобранных штаммов *P. pastoris*

Плазмиды рАОХ2-XylPum, рАОХ2-XylPaen, рАОХ2-XylTherm, рАОХ2-XylSch были линейризованы с использованием рестриктазы *Bgl*II, трансформированы и интегрированы в клетки штамма *P. pastoris* ВКПМ Y-2837 методом электропорации (http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf). Экспрессионные каскады были встроены АОХ2 локус посредством гомологической рекомбинации.

Трансформанты выращивали в среде YPD в течение 20 ч при 30 °С и аэрации 250 об/мин.

Клетки пересевали в пробирки со средой YPD в соотношении 1:10 и растили в течение 4 сут с аэрацией при 30 °С. Через каждые 24 ч в среду добавляли глюкозу до концентрации 2%.

Культивирование штаммов-продуцентов PpXylPum, PpXylPaen, PpXylTherm, PpXylSch проводилась в среде YPD в 500 мл колбах в течение 72 ч. Образцы объемом 1 мл отбирались каждые 24 ч.

После окончания ферментации определяли активность ферментов в культуральной жидкости.

Анализ активности ксиланаз

Определение ксиланазной активности проводили в пробе объемом 100 мкл, смешивая 50 мкл 1%-ного раствора субстрата ксилана березы в 0,5 М ацетатном буфере (рН 6) и 50 мкл образца фермента. Инкубацию проводили при 50 °С 10 мин.

Редуцированные сахара определялись DNS-методом с использованием глюкозы в качестве стандарта [10].

За единицу активности фермента принимали его количество, которое обеспечивало образование 1 мкмоль редуцированных сахаров за 1 мин.

Температурный и рН-оптимум действия фермента

Оптимум рН определяли инкубацией рекомбинантного белка использованием в качестве субстрата ксилана березы в буферах: 0,5 М глицировый (рН 2–3), 0,5 М ацетатный (рН 4–8), 0,5 М трис-буфер (рН 9).

Влияние рН на стабильность ферментов оценивали с использованием буферов с рН 2–9, используя те же буферные системы.

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

Таблица 1

Праймеры, использованные для амплификации генов ксиланаз

Primers used for amplification of xylanase genes

Название микроорганизма	Название праймера	Последовательность
<i>Bacillus pumilus</i>	XylPum-f	5'-aagaattccaacggcggtcgtttatga-3'
	XylPum-r	5'-aagcgccgcttatcttttgtgaacgca-3'
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	XylPaen-f	5'-aagaattcgcggggaatgtttttggaa-3'
	XylPaen-r	5'-aagcgccgctaattgctcgtgtattttac-3'
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	XylTherm-f	5'-aagaattatgtccaacccaaacctct-3'
	XylTerm-r	5'-aagcgccgctagtctgaggatcctcaagt-3'
<i>Schizophyllum commune</i>	XylSch-f	5'-aaagaattcatgggcactccctcatcca-3'
	XylSch-r	5'-ttaagtcaccgttattgtggcgta-3'

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

Термостабильность определяли измерением остаточной активности ферментов после инкубации при 70, 80, и 90 °С в течение 10 мин. Остаточная активность измерялась стандартным методом.

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

Влияние белковых ингибиторов злаков на активность ксиланаз

Ячмень предварительно измельчали до размера частиц 0,5 мм на мельнице MF 10.1 (ИКА, Германия). Для приготовления экстракта использовали 0,1 М ацетатный буфер, рН 6, из расчета 100 мл на 20 г измельченного ячменя. Экстракцию проводили в течении 1 ч при 40 °С, 140 об/мин в термошейкере TS-100С (Biosan, Латвия). Полученный экстракт центрифугировали 5 мин при g 13000.

Эффект устойчивости исследуемых ксиланаз к белковым ингибиторам был изучен при 15-минутной инкубации в присутствии экстракта ячменя при 37 °С с последующим измерением их остаточной специфической активности.

Устойчивость к протеолитическим ферментам

Эффект устойчивости к протеолитическим ферментам был изучен 15-минутным инкубированием исследуемых ксиланаз в присутствии 0,1% раствора пепсина при рН 2 и 0,1% раствора трипсина при рН 7 и температуре 37 °С с последующим измерением их остаточной специфической активности.

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) в течение 1 ч при напряжении 50 В, затем 2–3 ч при напряжении 150 В. Окрашивание белков осуществляли с использованием набора Pierce Silver Stain Kit (Thermo Scientific, Литва).

Очистка рекомбинантных ксиланаз

Очистку белков проводили с использованием колонок Microcon YM-50 (Millipore, Ирландия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для решения поставленной задачи исследовали ксиланазы различного происхождения в экспрессионной системе *Pichia pastoris*: двух бактериальных – ксиланазы из *Bacillus pumilus* ВКПМ В-7975 и *Paenibacillus polymyxa* ВКПМ В-3015, и двух грибных – ксиланазы из *Thermomyces lanuginosus* ВКПМ F-224 и *Schizophyllum commune* ВКПМ F-433: провели сравнение эффективности экспрессии соответствующих генов и изучили наиболее значимые с технологической точки зрения свойства ферментов: удельную активность, субстратную специфичность, термостабильность, температурный и рН-оптимум, устойчивость к различным значениям рН, устойчивость к протеолитическим ферментам и белковым ингибиторам ксиланаз злаков.

С технологической точки зрения, наиболее важными свойствами ферментов, применяемых в кормопроизводстве, являются: удельная активность, термостабильность, температурный и рН-оптимум их действия, устойчивость к различным значениям рН, устойчивость к протеолитическим ферментам, устойчивость к белковым ингибиторам ксиланаз злаков.

Термостабильность определяется как устойчивость ферментов к температурным режимам технологических процессов в течение определенного короткого промежутка времени (кратковременное нагревание до температуры 70–90 °С).

Для температурного оптимума работы ферментов характерно быть максимально приближенным к температуре тела животных (38–42 °С).

Учитывая условия внутри желудочно-кишечного тракта животных, к кормовым ферментам предъявляются требования сохранения активности в интервале рН от 2 до 8 с оптимумом рН от 4 до 8.

Устойчивость к действию пищеварительных протеаз также является необходимым условием использования ферментов в животноводстве [18, 19].

Важным свойством ксиланаз, используемых в кормопроизводстве, является также их устойчивость к белковым ингибиторам, присутствующим в составе злаков [20].

Экспрессия и ферментация рекомбинантных ксиланаз в *P. pastoris*

Для получения штамма-продуцента необходимо выбрать фермент с высоким уровнем экспрессии в штамме-хозяине.

Для сравнения эффективности экспрессии ксиланаз различного происхождения в клетках дрожжей *P. pastoris* был сконструирован экспрессионный интегративный вектор рАОХ2-GAP. В состав экспрессионной кассеты вектора входил GAP-промотор гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *P. pastoris*, позволяющий осуществлять высокоуровневую конститутивную экспрессию гетерологических генов и сигнальная последовательность α -фактора *Saccharomyces cerevisiae* для эффективной секреции белков. Экспрессионная кассета фланкирована нуклеотидными последовательностями, длина которых позволяет осуществлять преимущественно однокопийное встраивание в локус гена АОХ2 *Pichia pastoris* благодаря механизму гомологичной рекомбинации [21].

Фрагменты ДНК, кодирующие зрелые области ксиланаз *Bacillus pumilus* ВКПМ В-7975, *Paenibacillus polymyxa* ВКПМ В-3015, *Thermomyces lanuginosus* ВКПМ F-224, *Schizophyllum commune* ВКПМ F-433 были получены методом полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров (см. табл. 1), и клонированы в состав экспрессионного вектора рАОХ2-GAP. Таким образом были сконструированы экспрессионные плазмиды рАОХ2-GAP-XylPum, рАОХ2-GAP-XylPaen, рАОХ2-GAP-XylTherm, рАОХ2-GAP-XylSch, в состав которых входят гены эндо-1,4- β -ксилианаз *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus polymyxa*, *Thermomyces lanuginosus* и *Schizophyllum commune*, соответственно.

Экспрессионные плазмиды были линейаризованы и трансформированы в клетки *P. pastoris*. Для дальнейших исследований были отобраны клоны, в которых экспрессионные кассеты были интегрированы в локус АОХ2. Отобранные штаммы были названы PpXylPum, PpXylPaen, PpXylTherm, PpXylSch.

Культивирование отобранных штаммов проводили в среде YPD в 500 мл колбах в течение 72 ч с добавлением 2%-ной глюкозы через каждые 24 ч.

Ксиланазная активность в культуральной жидкости к концу ферментации для PpXylPum достигала 260 ед/мл, для PpXylPaen – 430 ед/мл, для PpXylTherm – 10,5 ед/мл и для PpXylSch – 63 ед/мл.

Анализ рекомбинантных белков

Исследование рекомбинантных ксиланаз проводили методом SDS-PAGE-электрофореза. В качестве образцов использовали супернатант культуральных жидкостей, содержащих секреторные белки.

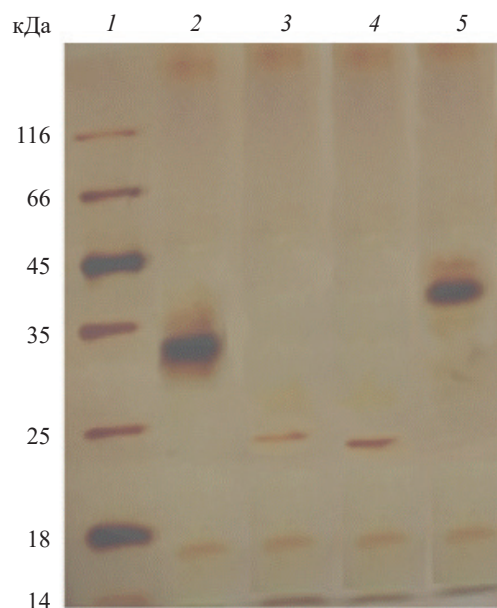


Рис. 1. SDS-PAGE-анализ рекомбинантных ксиланаз из: 2 – *Bacillus pumilus* (XylPum); 3 – *Thermomyces lanuginosus* (XylTherm); 4 – *Schizophyllum commune* (XylSch); 5 – *Paenibacillus polymyxa* (XylPaen). 1 – белковый маркер молекулярной массы

Fig. 1. SDS-PAGE of recombinant xylanases from: (2), *Bacillus pumilus* (XylPum); (3), *Thermomyces lanuginosus* (XylTherm); (4), *Schizophyllum commune* (XylSch); and (5), *Paenibacillus polymyxa* (XylPaen). (1), protein MM marker

На рис. 1 показано, что молекулярная масса секретируемой рекомбинантной ксиланазы из *Bacillus pumilus* составила примерно 30 кДа, ксиланазы из *Thermomyces lanuginosus* – 23 кДа, ксиланазы из *Schizophyllum commune* – 22 кДа, ксиланазы из *Paenibacillus polymyxa* – 38 кДа.

Молекулярная масса рекомбинантных ксиланаз из *Thermomyces lanuginosus* и *Schizophyllum commune* совпала с теоретически рассчитанной молекулярной массой (22,6 и 21 кДа, соответственно), в то время как молекулярная масса рекомбинантных ксиланаз из *Bacillus pumilus* и *Paenibacillus polymyxa* была больше теоретических значений 22,7 и 20,2 кДа, соответственно (табл. 2).

Вероятно, это связано с гликозилированием рекомбинантных белков. Анализ с использованием программы NetNGlyc 1.0 Server показал, что в составе аминокислотной последовательности зрелой ксиланазы из *Bacillus pumilus* присутствуют три сайта N-гликозилирования, зрелой ксиланазы из *Paenibacillus polymyxa* – шесть сайтов, зрелой

Характеристики рекомбинантных ксиланаз

Characteristics of recombinant xylanases

Фермент	Удельная (специфическая) активность, ед/мг белка	Молекулярная масса, кДа	
		фактическая	рассчитанная
XylPum	746	30	22,7
XylPaen	960	38	20,2
XylTherm	217	23	22,6
XylSch	1201	22	21,0

ксиланазы из *Thermomyces lanuginosus* – один сайт, в составе ксиланазы из *Schizophyllum commune* сайтов не было выявлено.

SDS-PAGE-анализ показал, что концентрация ксиланаз различного происхождения в исследуемых культуральных жидкостях существенно различается (рис. 1). Так, самая большая концентрация наблюдается для рекомбинантных ксиланаз из *Bacillus pumilus* и *Paenibacillus polymyxa*, в то время как концентрация ксиланаз из *Thermomyces lanuginosus* и *Schizophyllum commune* существенно ниже.

Это может свидетельствовать как о различной эффективности экспрессии рекомбинантных генов ксиланаз, так и об эффективности секреции белков.

Известно, что эффективность секреции может быть связана с присутствием в составе аминокислотных последовательностей рекомбинантных белков сайтов N-гликозилирования [22, 23].

Действительно, данные наших исследований показали, что наибольшая концентрация белка в культуральной жидкости наблюдается для наиболее гликозилированных ксиланаз из *Bacillus pumilus* и *Paenibacillus polymyxa*.

Удельную активность определяли для частично очищенных белков при оптимальных для каждого фермента условиях с использованием ксилана березы в качестве субстрата. Концентрацию белка определяли методом Бредфорд. Наибольшая удельная активность наблюдалась для ксиланазы из *Schizophyllum commune* – 1201 ед/мг белка (см. табл. 2).

Характеристика рекомбинантных ксиланаз

Характеристики рекомбинантных ксиланаз были исследованы в культуральных жидкостях с использованием ксилана березы в качестве субстрата.

pH оптимум. Для определения оптимальных условий работы исследуемых ксиланаз были использованы буферные растворы с диапазоном pH от 2 до 8 (рис. 2).

Исследования показали, что pH оптимум рекомбинантной ксиланазы из *Bacillus pumilus* равен 6. Фермент был активен при pH от 4 до 9 и сохранял более 50% активности при pH от 4,5 до 8,7. При pH 4 и ниже ферментативной активности не наблюдалось.

Рекомбинантная ксиланаза из *Paenibacillus polymyxa* проявляла активность в диапазоне pH от 3 до 9 и сохраняла более 50% активности при pH от 4,2 до 7,6. pH оптимум был равен 6. При pH ниже 3 фермент был неактивен.

pH оптимум рекомбинантной ксиланазы из *Thermomyces lanuginosus* был равен 5. Фермент был активен в диапазоне pH от 2 до 9, сохраняя 50% активности при pH от 3,5 до 7,8.

pH оптимум рекомбинантной ксиланазы из *Schizophyllum commune* был равен 4. Фермент был активен в диапазоне pH от 2 до 8, при этом 50% активности сохранялось в диапазоне pH от 2,5 до 7,5.

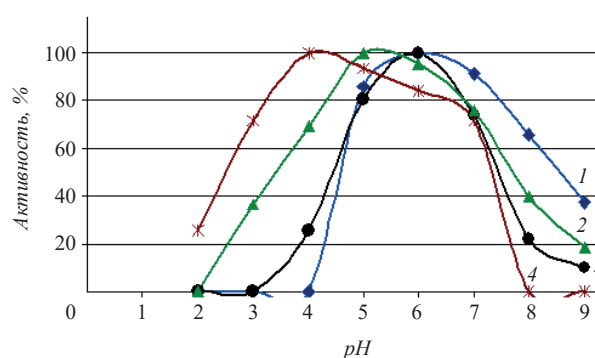


Рис. 2. Определение pH оптимума рекомбинантных ксиланаз из: 1 – *Bacillus pumilus* (XylPum); 2 – *Thermomyces lanuginosus* (XylTherm); 3 – *Paenibacillus polymyxa* (XylPaen); 4 – *Schizophyllum commune* (XylSch)

Fig. 2. pH Optima for recombinant xylanases from: (1) *Bacillus pumilus* (XylPum); (2), *Thermomyces lanuginosus* (XylTherm); (3), *Paenibacillus polymyxa* (XylPaen); and (4), *Schizophyllum commune* (XylSch)

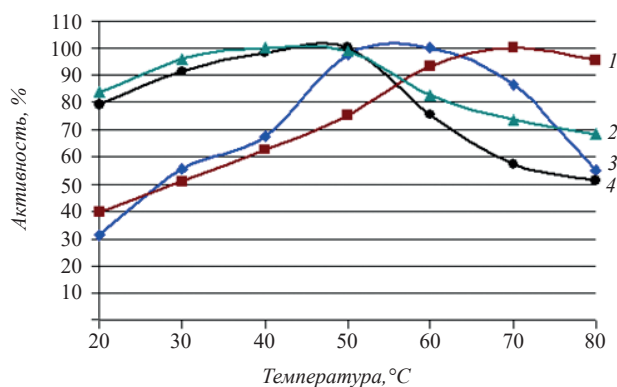


Рис. 3. Определение температурного оптимума рекомбинантных ксиланаз: 1 – из *Thermomyces lanuginosus* (XylTherm); 2 – из *Schizophyllum commune* (XylSch); 3 – из *Bacillus pumilus* (XylPum); 4 – из *Paenibacillus polymyxa* (XylPaen)

Fig. 3. Temperature optima for recombinant xylanases from: (1), *Thermomyces lanuginosus* (XylTherm); (2), *Schizophyllum commune* (XylSch); (3), *Bacillus pumilus* (XylPum); and (4), *Paenibacillus polymyxa* (XylPaen)

Таким образом, исследования показали, что pH оптимум всех исследованных ксиланаз соответствовали технологическим требованиям, необходимым для использования их в качестве кормовых ферментов.

Температурный оптимум. Определение оптимальных температур работы рекомбинантных ксиланаз проводили в диапазоне от 20 до 80 °C (рис. 3).

Температурный оптимум ксиланазы из *Bacillus pumilus* – 55 °C. Активность выше 80% от максимального уровня сохранялась в диапазоне от 45 до 75 °C и резко снижалась при более высоких или более низких температурах.

Температурный оптимум ксиланазы из *Paenibacillus polymyxa* определен в диапазоне 40–50 °C. Уровень активности фермента выше 80% сохранялся в пределах от 20 до 55 °C и резко снижался при более высоких температурах.

Температурный оптимум ксиланазы из *Thermomyces lanuginosus* равнялся 70 °C, при этом активность выше 80% сохранялась в диапазоне от 55 до 80 °C и резко снижается при более низких температурах.

Температурный оптимум ксиланазы из *Schizophyllum commune* находился в диапазоне от 40 до 50 °C. Уровень активности фермента выше 80% сохранялся при температуре 20–60 °C.

Исследования показали, что наиболее оптимальными свойствами обладают рекомбинантные ксиланазы из *Paenibacillus polymyxa* и *Schizophyllum commune*, специфическая активность которых при оптимальных для кормопроизводства температурах составляла 98–100%, в то время как этот показатель для рекомбинантных ксиланаз из *Bacillus pumilus* и *Thermomyces lanuginosus* не превышал 65%.

pH-стабильность. Влияние pH на стабильность ферментов было изучено инкубированием исследуемых ксиланаз в буферах с pH 2–9 при 37 °C 30 мин с последующим измерением их специфической активности. На рис. 4 видно, что все четыре ксиланазы показали высокие уровни pH-стабильности (стабильная активность при pH от 3 до 9). При pH 2 все ферменты показали незначительное снижение активности. Таким образом, по данному показателю исследуемые ксиланазы могут быть использованы в кормопроизводстве.

Термостабильность. Для исследования термостабильности рекомбинантные ксиланазы подвергали прогреванию при 70 °C, 80 °C и 90 °C в течение 10 мин, после чего измеряли их остаточную специфическую активность (рис. 5).

Результаты исследований показали, что рекомбинантная ксиланазы из *Bacillus pumilus* обладает

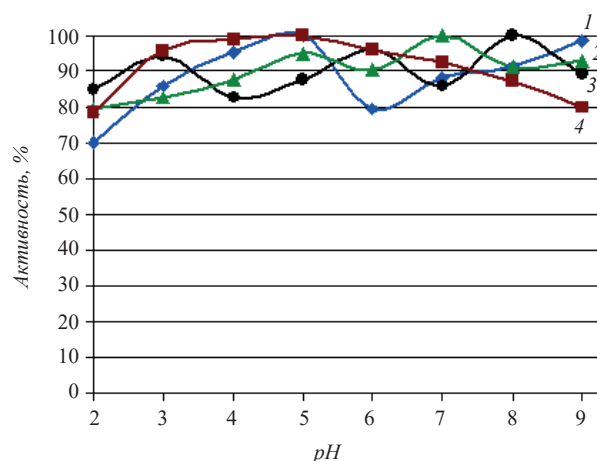


Рис. 4. Стабильность рекомбинантных ксиланаз в зависимости от значений pH: 1 – рекомбинантная ксиланазы XylPum из *Bacillus pumilus*; 2 – XylTherm из *Thermomyces lanuginosus*; 3 – XylPaen из *Paenibacillus polymyxa*; 4 – XylSch из *Schizophyllum commune*

Fig. 4. pH-Stability of recombinant xylanases from: (1), *Bacillus pumilus* (XylPum); (2), *Thermomyces lanuginosus* (XylTherm); (3), *Paenibacillus polymyxa* (XylPaen); and (4), *Schizophyllum commune* (XylSch)

СРАВНЕНИЕ КСИЛАНАЗ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

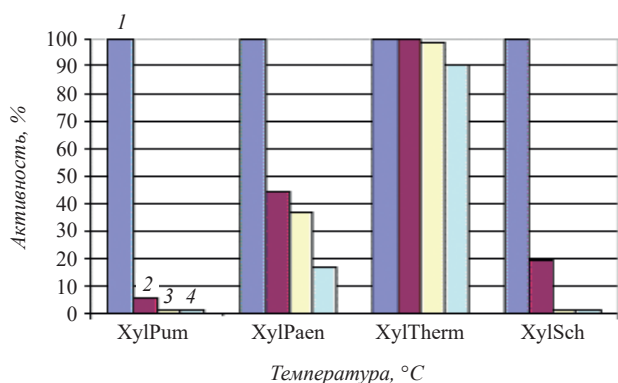


Рис. 5. Термостабильность рекомбинантных ксиланаз при нагревании до 70 °С (2), 80 °С (3) и 90 °С (4). 1 – контроль без прогрева

Fig.5. Thermal stability of recombinant xylanases, when heated to 70 °C (2), 80 °C (3) and 90 °C (4). 1 – control without heating

низкой термостабильностью – остаточная активность этого фермента не превышала 6%, 1% и 0% после прогревания при 70 °С, 80 °С и 90 °С, соответственно. Рекомбинантная ксиланаза из *Paenibacillus polymyxa* проявляла умеренную термостабильность, так как остаточная активности при десятиминутном прогревании составила 45, 36 и 17%, соответственно температуре прогрева 70 °С, 80 °С и 90 °С. Рекомбинантная ксиланаза из *Thermomyces lanuginosus* показала очень высокую термостабильность ее остаточная активность была зафиксирована на уровне 100, 98,7 и 90,3%. Остаточная активность рекомбинантной ксиланазы из *Schizophyllum commune* 19, 1 и 0% указывала на низкую термостабильность данного фермента.

Устойчивость к пищеварительным ферментам. Эффект устойчивости к протеолитическим ферментам был изучен 15-минутным инкубированием исследуемых ксиланаз в присутствии 0,1%-ного раствора пепсина при pH 2 и 0,1%-ного раствора трипсина при pH 7 с последующим измерением их специфической активности (рис. 6).

Остаточная специфическая активность ксиланазы из *Bacillus pumilus* после воздействия трипсина и пепсина составила 88 и 90% соответственно, ксиланазы из *Paenibacillus polymyxa* – 78 и 83%, ксиланазы из *Thermomyces lanuginosus* – 96 и 97%, ксиланф из *Schizophyllum commune* – 96 и

74%. Таким образом, все исследуемые ферменты были достаточно устойчивы к действию пищеварительных протеаз.

Устойчивость к белковым ингибиторам ксиланаз злаков. Рекомбинантные ксиланазы подвергали воздействию белковых ингибиторов, содержащихся в экстракте зерен ячменя, с последующим измерением остаточной специфической активности ферментов. Инкубация в присутствии экстракта зерен ячменя не привела к уменьшению активности исследованных рекомбинантных ферментов более чем на 10%, что говорит об их высокой устойчивости белковым ингибиторам ксиланаз злаков.

Субстратная специфичность рекомбинантных ксиланаз. Субстратная специфичность является важной характеристикой фермента. Сравнение специфической активности рекомбинантных ксиланаз проводили с использованием следующих субстратов: ксилан березы, арабиноксилан, карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза) и β-глюкан ячменя (табл. 3).

Все исследованные рекомбинантные ксиланазы показали самую большую специфичность при использовании в качестве субстрата ксилана березы. Специфичность к арабиноксилану была существенно ниже – от 46,9% от максимального уровня для ксиланазы из *Bacillus pumilus* до 59,2% для ксиланазы из *Schizophyllum commune*.

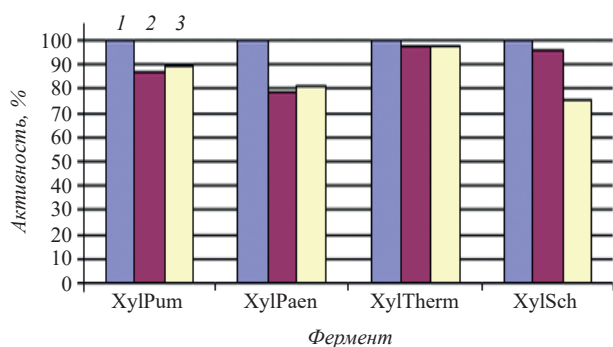


Рис. 6. Устойчивость рекомбинантных ксиланаз к пищеварительным ферментам. 1 – контроль без воздействия пищеварительных ферментов; 2 – воздействие трипсина; 3 – воздействие пепсина

Fig. 6. Resistance of recombinant xylanases to digestive enzymes: (1), control (without digestive enzymes); (2), effect of trypsin; and (3), effect of pepsin

Субстратная специфичность рекомбинантных ксиланаз

Substrate specificity of recombinant xylanases

Субстрат	Активность, %			
	XylPum	XylPaen	XylTherm	XylSch
Ксилан березы	100	100	100	100
Арабиноксилан	46,9	47,5	56,7	59,2
КМ-целлюлоза	0,6	3,9	9,3	0,8
β -глюкан ячменя	1,2	6,9	10,0	9,2

β -глюкан ячменя и целлюлоза гидролизовались гораздо в меньшей степени.

При выборе фермента, используемого в кормопроизводстве, важное значение имеет его способность гидролизовать арабиноксилан, так как арабиноксилан является основным некрахмальным полисахаридом, входящим в состав зерен злаков.

Полученные данные дают основание утверждать, что все четыре исследованные ксиланазы потенциально могут быть использованы как ферменты кормовых добавок, так как их способность гидролизовать арабиноксилан близка или превышает 50% от максимального уровня.

Результаты данной работы позволили провести сравнение ксиланаз различного происхождения в единой экспрессионной системе *P. pastoris* с соблюдением условий одинакового места интеграции и копийности экспрессионной кассеты в составе хромосомы штамма-хозяина и отобрать белок с оптимальными свойствами для создания на его основе рекомбинантного дрожжевого продуцента, который будет эффективно использоваться в кормопроизводстве.

Так, дрожжевой штамм, созданный на основе рекомбинантной ксиланазы из *Bacillus pumilus* ВКПМ В-7975 (XylPum), является достаточно продуктивным. Ген, кодирующий фермент, способен эффективно экспрессироваться в клетках дрожжей, в процессе ферментации белок эффективно секретируется в культуральную жидкость, имеет достаточно высокую удельную активность, проявляет высокую рН стабильность, высокую устойчивость к пищеварительным ферментам и белковым ингибиторам ксиланаз зерна, способен к гидролизу арабиноксилана. Однако его низкая термостабильность, узкий рабочий диапазон рН и рабочий диапазон температур, не соответствующий температуре тела сельскохозяйственных животных, показывают, что использование этого фермента в качестве компонента комбикормов нецелесообразно.

Исследование рекомбинантной ксиланазы из *Paenibacillus polymyxa* ВКПМ В-3015 (XylPaen) показало, что дрожжевой штамм, созданный на основе этого фермента, является продуктивным, ген, кодирующий фермент, способен эффективно экспрессироваться в клетках дрожжей, в процессе ферментации белок эффективно секретируется в культуральную жидкость, имеет высокую удельную активность, проявляет высокую рН стабильность, высокую устойчивость к пищеварительным ферментам и белковым ингибиторам ксиланаз зерна, способен к гидролизу арабиноксилана. Кроме того, рабочий диапазон рН и рабочий диапазон температур фермента и его умеренная термостабильность соответствуют технологическим требованиям, предъявляемым к ксиланазам, используемым в качестве кормовых добавок к комбикормам сельскохозяйственных животных.

Рекомбинантная ксиланаза из *Thermomyces lanuginosus* ВКПМ F-224 (XylTerm) отличалась очень высокой термостабильностью, широким рН диапазоном, высокой рН стабильностью, устойчивостью к пищеварительным ферментам и белковым ингибиторам ксиланаз зерна, способностью к гидролизу арабиноксилана. Однако рабочий температурный диапазон данного фермента не соответствует температуре тела сельскохозяйственных животных. Фермент имеет низкую удельную активность. Кроме того, дрожжевой штамм, созданный на основе этого фермента, является малопродуктивным, концентрация белка в культуральной жидкости низкая, возможно из-за недостаточной эффективности экспрессии гена, кодирующего данный фермент, и низкой эффективности секреции белка в культуральную жидкость в процессе ферментации.

Рекомбинантная ксиланаза из *Schizophyllum commune* ВКПМ F-433 (XylSch) обладает высокой удельной активностью, широким диапазоном рабочих рН и температур, проявляет высокую

pH стабильность, высокую устойчивость к пищеварительным ферментам и белковым ингибиторам ксиланаз зерна, способен к гидролизу арабиноксилана, однако проявляет низкую термостабильность. Кроме того, дрожжевой штамм, созданный на основе этого фермента, является недостаточно продуктивным, возможно из-за недостаточной экспрессии ген, кодирующий фермент, или недостаточной секрецией белка в культуральную жидкость, связанной, возможно, с отсутствием гликозилирования.

Таким образом, оптимальный фермент, обладающий свойствами, необходимыми для использования его в качестве кормовой добавки и для эффективной экспрессии в клетках дрожжей *P. pastoris* – это ксиланаза из *Paenibacillus polymyxa* (XylPaen).

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI60717X0180) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

ЛИТЕРАТУРА

- 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. β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems, biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1993, 5, 17, 259–289.
- Kulkarni N., Shendye A., Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS. Microbiol. Rev.*, 1999, 5(23), 411–456.
- Coughlan M.P., Hazlewood G.P. β -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 doi:10.1080/07388550290789450
- Harris A. D., Ramalingam C. Xylanases and its application in food industry: a review. *J. Experimental Sciences*, 2010, 1(7), 1–11.
- Beg Q. K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 56, 326–338. doi: 10.1007/s002530100704
- Gellissen G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, 54(6), 741–750.
- Cereghino J. L., Cregg J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS. Microbiol. Rev.*, 2000, 24, 45–66. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x
- Sumner J. B., Somers G. F. Dinitrosalicylic method for glucose. In: Laboratory expression in biological chemistry. *Academic Press*, New York, 1949.
- Teixeira M. C., Alcazar A. C., Princi E. Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilus*. *Brazilian J. Microbiology*, 2000, 31, 90–94. doi: 10.1590/S1517-83822000000200005
- Maha T. H., Emam, Karima A. et al. Cloning, sequencing and expression of the xylanase gene from *Bacillus pumilus* GH in *Escherichia coli*. *Int. J. Chem. Tech. Res.*, 2016, 9(12), 114–124.
- Yang R.C.A., Mackenzie C.R., Bilous D. et al. Molecular cloning and expression of a xylanase gene from *Bacillus polymyxa* in *Escherichia coli*. *Appl. Environment. Microbiol.*, 1988, 54(4), 1023–1029.
- Morales P., Madarro A., Perez-Gonzalez J. A. et al. Purification and characterization of alkaline xylanases from *Bacillus polymyxa*. *Appl. Environment. Microbiol.*, 1993, 59(5), 1376–1382.
- Khucharoenphaisan K., Sinma K. β -xylanase from *Thermomyces lanuginosus* and its biobleaching application, *Pakistan J. Biological Sci.*, 2010, 13(11), 513–526.
- Oku T., Roy C., Watson D.C. et al. Amino acid sequence and thermostability of xylanase A from *Schizophyllum commune*. *FEBS*, 1993, 334(3), 296–300.
- Paice G., Jurasek L., Carpenter M.R., Smillie L.B. Production, characterization, and partial amino acid sequence of xylanase A from *Schizophyllum commune*. *Appl. Environment. Microbiol.*, 1978, 36(6), 802–808.
- Fernandes P. Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme Res.*, 2010, 2010, 3–21. doi:10.4061/2010/862537
- Bustany A.Z. The effect of pelleting an enzyme-supplemented barley-based broiler diet. *Animal Feed Science Technology*, 1996, 58(3), 283–288.
- Гусаков А.В. Белковые ингибиторы микробных ксиланаз. *Биохимия*, 2010, 75(10), 1331–1347.
- Naatsaari L., Mistlberger B., Ruth C., et al. Deletion of the *Pichia pastoris* KU70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology. *PLoS ONE*, 2012, 7, e39720. doi: 10.1371/journal.pone.0039720

22. Sagt B., Kleizen R., Verwaal M. D. M., et.al. Introduction of an N-Glycosylation site increases secretion of heterologous proteins in yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66(11), 4940–4944.
23. Minghai H., Xiaobin Y. Enhanced expression of heterologous proteins in yeast cells via the modification of N-glycosylation sites. *Bioengineered*, 2015, 6(2), 115–118. doi: 10.1080/21655979.2015.1011031

Comparison of Xylanases of Different Origin in Expression System of *Pichia pastoris*: Gene Expression, Biochemical Characteristics and Biotechnological Potential

A.N. KALININA¹, L.N. BORSHCHEVSKAYA^{1*}, T.L. GORDEEVA¹, and S.P. SINEOKY¹

¹State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center "Kurchatov Institute" (NRC "Kurchatov Institute" - GOSNIIGENETIKA), 117545, Moscow Russia

*e-mail: larisa.larbor3@yandex.ru

Received May 25, 2018

Accepted July 06, 2018

Abstract—The expression of the genes for endo-1,4- β -xylanase from *Bacillus pumilus* VKPM \hat{A} -7975, *Paenibacillus polymyxa* VKPM \hat{A} -3015, *Thermomyces lanuginosus* VKPM F-224, and *Schizophyllum commune* VKPM F-433, members of the family of 11 glycohydrolases, in the expression system of *Pichia pastoris* has been assessed. Such technologically valuable characteristics of the recombinant hydrolases, as specific activity, pH and thermal stability, temperature and pH optima, resistance to digestive enzymes and xylanase protein inhibitors from cereals, and substrate specificity were investigated. It was shown that the enzyme from *Paenibacillus polymyxa* has the highest biotechnological potential for the creation of xylanases on the basis of the recombinant *Pichia pastoris* yeast strains in order to use them in the fodder production.

Key words: fodder enzymes, xylan, xylanase, *Pichia pastoris*.

Acknowledgements—The work was financially supported by the Ministry for Education and Science (Project Unique Identifier RFMEFI60717X0180) using Unique Scientific Organization of National Bioresource Center All-Russian Collection of Industrial Microorganisms, NRC «Kurchatov Institute»—GOSNIIGENETIKA.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-4-26-36