

УДК 579.66

Экспрессия гена ксиланазы из *Pyromyces finnis* в *Pichia pastoris* и характеристика рекомбинантного белка

© 2019 А.Н. КАЛИНИНА^{1,*}, Л.Н.БОРЩЕВСКАЯ¹, 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: anna.kalininaa@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.06.2019 г

После доработки 17.06.2019 г

Принята к публикации 11.07.2019 г.

Описана гетерологическая экспрессия и характеристика новой ксиланазы из *Pyromyces finnis*. Эндо-1,4-β-ксиланаза Ху1Р (ЕС 3.2.1.8) состоит из 223 аминокислот и 19 остатков предполагаемого сигнального пептида в N-концевой области. Аминокислотная последовательность зрелого белка имеет наибольшую гомологию с последовательностью нативного каталитического N-терминального домена эндо-1,4-β-ксиланазы из *Neocallimastix patriciarum* (84%). Синтетическая нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелый белок Ху1Р, была экспрессирована в *Pichia pastoris*. Очищенный рекомбинантный фермент показал активность на ксилане березы и арабиноксилане. При использовании ксилана березы в качестве субстрата оптимальный pH – 5, а оптимальная температура – 50 °С. Значение удельной активности ксиланазы составило 4700 ед/мг белка, K_m и V_{max} имели значения 0,51 мг/мл и 7395,3 мкмоль/мин·мг, соответственно. Рекомбинантный белок Ху1Р показал умеренную термостабильность и высокую pH-стабильность, устойчивость к пищеварительным ферментам и белковым ингибиторам ксиланаз зерна. Показано также, что ионы Mg^{2+} , Co^{2+} и Li^+ оказывают позитивное влияние на активность фермента.

Ключевые слова: ксиланаза, ксилан, кормовой фермент, *Pichia pastoris*, *Pyromyces finnis*.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-24-32

Ксиланы являются одними из основных структурных компонентов клеточной стенки растений и составляют примерно треть возобновляемой растительной биомассы на Земле [1]. Это гетерополимеры, которые состоят из линейной цепочки соединенных β-1,4-гликозидными связями остатков D-ксилозы, частично ацелированных и имеющих в боковых цепях заместители в виде остатков D-глюкуроновой кислоты, α-L-арабинозы, феруловой и пара-кумаровой кислот [2, 3]. Структура ксиланов существенно зависит от вида растений.

Главными компонентами комплекса ферментов, осуществляющих деструкцию ксиланов в природе, являются эндо-1,4-β-ксиланазы (КФ 3.2.1.8). Ксиланазы широко применяют в процессах био-конверсии лигноцеллюлозных отходов, в цел-

люлозно-бумажной промышленности, при производстве комбикормов для животных и птиц [4, 5].

Основными источниками ксиланаз являются микроорганизмы – бактерии, археи, микроскопические грибы и дрожжи [6, 7].

Однако не все ксиланазы обладают свойствами, необходимыми для их промышленного применения: высокой удельной активностью, достаточной термостабильностью, а также устойчивостью по отношению к белковым ингибиторам злаков. Последние оказывают негативное действие на ксиланазы при использовании этих ферментов в качестве компонентов комбикормов [8]. Поэтому поиск новых ксиланолитических ферментов и исследование их свойств является актуальной задачей.

Список сокращений: YPD-среда – питательная среда для роста дрожжей; SDS – лаурилсульфат натрия; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA); ДНС – 3,5-динитросалициловая кислота (3,5-Dinitrosalicylic acid, DNS); ДНС-метод – метод определения ферментативной активности ксиланазы с ДНС-реактивом; ПЦР – полимеразная цепная реакция; КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза.

Из литературных данных следует, что анаэробные грибы семейства Neocallimastigomycota, выделенные из рубца животных, производят комплекс гидролитических ферментов, позволяющих разрушать клеточную стенку растений, высвобождая питательные вещества [9]. Кроме того, целлюлолитические ферменты у анаэробных грибов обладают значительно большей удельной активностью, чем таковые у аэробных грибов [10–13].

Для данной группы микроорганизмов описаны все известные ферменты гидролиза целлюлозы и гемицеллюлозы клеточных стенок растений, таких как β-глюканы, маннаны и ксиланы [14–18], что подтверждает высокий потенциал анаэробных грибов в качестве источника высокоэффективных гидролитических ферментов. Однако, анаэробные грибы не могут быть использованы в промышленном производстве ферментов из-за их строго анаэробного и медленного роста. Поэтому создание рекомбинантных штаммов-продуцентов ферментов из анаэробных грибов на основе высокоэффективных дрожжевых экспрессионных систем является актуальной задачей.

Попытки конструирования рекомбинантных штаммов-продуцентов ферментов из анаэробных грибов на основе дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*, *Hypocrea jecorina*, *Pichia pastoris* и *P. methanolica*) описаны во многих литературных источниках, однако, часто продуктивность штаммов оказывалась невысокой или рекомбинантные белки были каталитически неактивны [19–22]. Возможно, это связано с низкой эффективностью экспрессии гетерологических генов, с неоптимальным выбором штамма-реципиента, штамма-хозяина или генно-инженерных конструкции.

Цель данного исследования – клонирование и экспрессия гена, кодирующего ксиланазу из анаэробного гриба *Pyromyces finnis*, относящегося к семейству Neocallimastigomycota и выделенного из рубца жвачных животных, в экспрессионной системе метилотрофных дрожжей *P. pastoris* и исследование свойств рекомбинантного фермента

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Микроорганизмы, питательные среды, плазмиды

Для генно-инженерных работ был использован штамм *Escherichia coli* XL1-Blue (*endA1 supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac hsdR17 F'*[proAB lacIqΔM15 Tn10], ВКПМ В-9838.

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

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

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей были использованы 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 консервативных доменов использована программа CD-search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), для поиска возможных сигнальных последовательностей – программа SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Множественное выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Для исследования трехмерных структур ферментов был использован сервер SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) и база NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=XGGZ1VF0014&mode=all>), для поиска сайтов гликозилирования – сервер NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Синтез гена и оптимизация кодонов

Аминокислотная последовательность предполагаемой ксиланазы *Pyromyces finnis* (GenBank: ORX45769.1) была преобразована в нуклеотидную при помощи сервиса предсказания нуклеотидной последовательности по аминокислотной (http://molbiol.ru/scripts/01_19.html). Оптимизация кодонного состава гена проводилась в программе GenScript (<https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis>). Для синтеза гена использовали метод, основанный на олигонуклеотидах и описанный ранее [23]. Синтетический ген *xy1P* был секвенирован и депонирован в Genbank под номером MN066163.

Конструирование рекомбинантной экспрессионной плазмиды

Фрагмент ДНК, кодирующий зрелый белок Xy1P, был амплифицирован методом ПЦР с использованием *Pfu* ДНК-полимеразы (Fermentas),

двух праймеров XylPf-f 5'-aaagaattccaatcttctgtctctctgctct-3' и XylPf-r 5'-aaagcggccgc ttagatgtaaaccttagcg-tatgggaagtc-3'. Амплифицированный продукт, кодирующий зрелый фермент ксиланазу, был клонирован в состав вектора pAOX2-GAP [24], в результате чего была получена рекомбинантная плаزمид, pAOX2-GAP-XylPf. Последовательность, кодирующая ксиланазу, была встроена в рамку считывания с сигнальной последовательностью вектора.

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

Плазмид pAOX2-GAP-XylPf была линейаризована с использованием эндонуклеазы рестрикции *Bgl*III и трансформирована в клетки штамма *P. pastoris* ВКПМ Y-2837 методом электропорации (http://tools.thermo-fisher.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf). Экспрессионная кассета была встроена в AOX2 локус посредством гомологичной рекомбинации.

Рекомбинантные штаммы выращивали в среде YPD в течение 20 ч при 30 °С и аэрации 250 об/мин, затем клетки пересеивали в пробирки со средой YPD в соотношении 1:10 и растили в течение 4 сут при тех же условиях. Через каждые 24 ч добавляли 2% глюкозы. После окончания ферментации определяли активность фермента в культуральной жидкости. Штамм с самой высокой ксиланазной активностью использовали для дальнейших исследований.

Очистка рекомбинантной ксиланазы

Очистка ксиланазы проводилась с использованием метода гель-хроматографии [25] на колонке Superdex 75-NR. Образцы культуральной жидкости были приготовлены с помощью диализа против буфера (50 мМ трис-HCl; pH 7,0; 0,5 М NaCl) в течение ночи, сконцентрированы на установке Amicon через мембрану с порогом отсечения 10 кДа и нанесены на колонку, 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 с помощью УФ-детектора при длине волны 280 нм. Фракции, соответствующие пику ксиланазы отбирали для дальнейшего анализа. Количество белка определяли по методу Бредфорда согласно инструкции к Bradford Reagent B 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 белков проводили с использованием 0,1%-ного раствора Кумасси голубого R250 («Диа-М»).

Анализ ферментативной активности

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

Редуцированные сахара определяли ДНС-методом с использованием глюкозы в качестве стандарта [26].

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 (Megazame, США), карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) («Химмед»), лихенина (Serva, Германия) и β-глюкана ячменя (Megazame).

Исследование влияния белковых ингибиторов злаков

Ячмень предварительно измельчали до размера частиц 0,5 мм на мельнице «MF 10.1» (КА, Германия). Для приготовления экстракта использовали 0,1 М ацетатный буфер pH 6 из расчета 100 мл буфера на 20 г измельченного ячменя. Экстракцию проводили в течении 1 ч при 40 °С при перемешивании 140 об/мин в термошейкере TS-100С (Biosan, Латвия). Полученный экстракт центрифугировали 5 мин при 2000 g.

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

Характеристика рекомбинантного белка XylP

Оптимальный pH определяли инкубацией очищенного рекомбинантного белка XylP с использованием в качестве субстрата ксилана березы в буферных растворах: 0,5 М глициновый (pH 2–3), 0,5 М ацетатный (pH 4–6), 0,5 М трис-HCl (pH 7–9).

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

Температурный оптимум определяли, проводя стандартное исследование активности фермента в диапазоне температур 30–80 °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.

Определение влияния ионов металлов и химических реактивов на реакции гидролиза ксилана березы проводилось измерением активности фермента в буфере с добавлением 1мМ соответствующих реагентов.

K_m и V_{max} рекомбинантного XylP определяли согласно методу двойных обратных величин Лайнуивера-Берка, измеряя активность фермента при 50 °С в 0,5 М ацетатном буфере pH 5 с использованием 2,5–10 мг/мл ксилана березы в качестве субстрата.

Эффект устойчивости к протеолитическим ферментам был изучен 30-минутным инкубированием XylP при 37 °С в присутствии 0,1%-ного раствора пепсина (pH 2) и 0,1%-ного раствора трипсина (pH 7) 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 И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве объекта исследования была выбрана приведенная в базе данных GenBank аминокислотная последовательность белка из анаэробного гриба *Pyromyces finnis* семейства *Neocallimastigomycota*, выделенного из рубца жвачных животных (GenBank: ORX45769.1). Компьютерный анализ данной последовательности, проведенный с помощью программы поиска консервативных доменов CD-search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) дал возможность предположить, что белок имеет признаки, соответствующие эндо-1,4-β-ксилазнам.

Анализ аминокислотной последовательности с использованием программы SignalP 4.1 позволил определить возможную сигнальную последовательность, которая составила 19 N-концевых аминокислот. Таким образом, была определена последовательность зрелого белка XylP (рис.1).

Анализ аминокислотной последовательности на основании множественного выравнивания, анализ пространственной структуры, проведенный с использованием информационных ресурсов базы данных NCBI, а также анализ трехмерной модели XylP, предсказанной с использованием сервера SWISS-MODEL на основании структуры наиболее гомологичного нативного каталитического N-терминального домена эндо-1,4-β-ксилаказы из *Neocallimastix patriciarum* [27], позволили выявить аминокислоты консервативного мотива гидролаз семейства GH11 (рис. 2).

На основании аминокислотной последовательности была разработана и синтезирована оптимизированная нуклеотидная последовательность, представляющая собой область, кодирующую зрелый белок ксиланазы XylP. Оптимизация нуклеотидной последовательности проводилась в соответствии с частотой встречаемости кодонов метилотрофных дрожжей *P. pastoris*.

Для экспрессии рекомбинантного белка XylP в *P. pastoris* был использован вектор pAOX2-GAP, в состав экспрессионной кассеты которого входит GAP промотор гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *P. pastoris*, позволяющий осуществлять высокоуровневую конститутивную экспрессию гетерологичных генов, и сигнальная последовательность α-фактора *Saccharomyces cerevisiae* для эффективной секреции белков. В качестве области интеграции экспрессионной кассеты в хромосому дрожжевых клеток была использована последовательность гена AOX2 *P. pastoris*.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая область зрелого белка XylP, была амплифицирована методом ПЦР с использованием

MKFSQFIPVALSFATSALAQSFCSASHSGQSVKETGNKVGSI~~GGVGYEMWADSG~~**NNS**ATFYSDGSFSCSFSNAKDYL~~CRSGLSFDSTQSHSQIGHMYADFKLVKQNIANVDYSYVGIYGWTRN~~PLVEFYIVDNWLSQYRPGDWVGNKKHGD~~FIIDGAQYTVFENTRFGPSIDGDTQFKQYF~~SIRQTPRDCGTIDISAHFAQWEKLGMTMGKMHEAKVLGEAGSNGAGTSGTADFPYAKVYI

Рис. 1. Аминокислотная последовательность XylP. Подчеркнута возможная сигнальная последовательность. Красным цветом выделены возможные сайты N-гликозилирования

Fig. 1. The amino acid sequence XylP. Underlining indicates a possible signal sequence; in red, possible sites of N-glycosylation

```

N. patriciarum AEFQSFCSASHSGQSVKVTGNKVGTTIGGVGYELWADSGMNSATFYSDGSFSCFTFQNA GD
XylP          ---QSFCSASHSGQSVKETGNKVGSIIGGVGYEMWADSGMNSATFYSDGSFSCSF SNAKD
                *****:*****:*****:*****:*.** *

N. patriciarum YLCRSGLSFDSTKTTPSQIGRMKADFKLVKQNSSNVGYSYVGVYGWTRSPLVEYYIVDNWL
XylP          YLCRSGLSFDSTQSHSQIGHMYADFKLVKQNIANVDYSYVGIYGWTRNPLVEFYIVDNWL
                *****: *****:* ***** :**.******:*****.******

N. patriciarum SPFPPGDWVGNKKHGSFTIDGAQYTVYENTRTGPSIDGDTTFNQYFSIRQQARDCGTIDI
XylP          SQYRPGDWVGNKKHGDFIIDGAQYTVFENTRFRGPSIDGDTQFKQYFSIRQTFRDCGTIDI
                * : *****.* *****:***** ***** * :***** .*****

N. patriciarum SAHFDQWEKLGMTMGKLEHAKVLGEAGNVNGGASGTADFYPYAKVYIGD
XylP          SAHFAQWEKLGMTMGKMHEAKVLGEAGSNGAGTSGTADFYPYAKVYI--
                **** *****:*****. .*:*****

```

Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей ксиланазы *Pyromyces finnis* (XylP) и родственного фермента – нативного каталитического N-терминального домена эндо-1,4- β -ксиланазы из *Neocallimastix patriciarum*. Красным цветом выделены аминокислоты консервативного мотива гидролаз семейства GH11. (*) – идентичные аминокислотные остатки во всех последовательностях в выравнивании; (:) – консервативные аминокислотные замены (.) – полуконсервативные аминокислотные замены

Fig. 2. Alignment of amino acid sequences of XylP (xylanase from *Pyromyces finnis*) and related enzymes from *Neocallimastix patriciarum*, native catalytic N-terminal domain of endo-1,4- β -xylanase. Amino acids of a conservative motif of GH11 family hydrolases are highlighted in red. (*) , identical amino acid residues in all sequences in alignment; (:), conservative amino acid substitutions; (.), semi-conservative amino acid substitutions

праймеров XylPf-f и XylPf-r и клонирована в единую рамку считывания с сигнальной последовательностью α -фактора. Таким образом, была сконструирована экспрессионная плаزمида pAOX2-GAP-XylP.

Экспрессионная плазмида была линейаризована и трансформирована в клетки *P. pastoris*. Трансформант XylP-28 показал самую высокую ксиланазную активность среди 319 положительных клонов.

Ферментация штамма XylP-28 проводилась в 500-мл колбе в течение 120 ч. Образцы объемом 1 мл отбирались каждые 24 ч. Результаты SDS-PAGE-анализа показали, что повышенные концентрации рекомбинантного белка XylP происходило с увеличением времени ферментации. Повышение уровня накопления фермента в культуральной жидкости коррелировало с увеличением ксиланазной активности. Ферментативная активность к концу ферментации достигала 830 ед/мл.

Рекомбинантный белок был очищен методом гель-хроматографии. По результатам проведенного SDS-PAGE-электрофореза, молекулярный вес очищенного рекомбинантного фермента составил 30 кДа, что несколько больше, чем теоретически рассчитанный вес – 24,5 кДа (рис. 3). Предположительно, это связано с посттрансляционными модификациями белка в дрожжевых клетках, вызванными гликозилированием. Как показал ана-

лиз аминокислотной последовательности, проведенный с использованием программы NetNGlyc 1.0 Server, в составе белка XylP присутствует один сайт N-гликозилирования Asn-X-Ser/Thr [28] (рис. 1).

Очищенный рекомбинантный фермент XylP показал высокую удельную активность

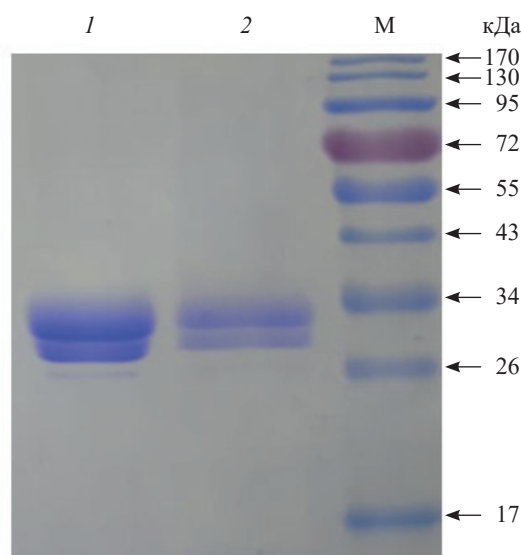


Рис. 3. SDS-PAGE-анализ белка XylP. 1 – очищенный XylP; 2 – неочищенный XylP; М – белковый маркер молекулярной массы

Fig. 3. SDS-PAGE analysis of XylP protein: lane 1, purified XylP protein; lane 2, unpurified XylP protein; M, standard protein molecular weight (Thermo Scientific)

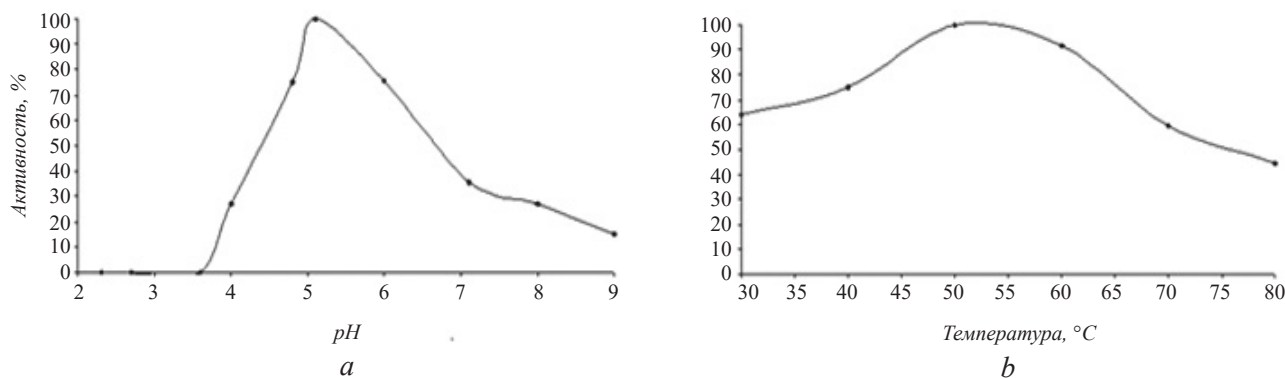


Рис. 4. Характеристики рекомбинантного ХуIP: *a* – влияние pH на активность; *b* – влияние температуры на активность. Данные, приведенные на графиках, представляют собой средние значения, полученные в результате проведения трех независимых измерений с учетом погрешности измерения ($p < 0,05$)

Fig. 4. Characterization of recombinant XylIP. (*a*), effects of pH on activity; (*b*), effects of temperature on activity. The data shown in the graphs represent the average value obtained as a result of three independent measurements, taking into account the measurement error ($p < 0.05$)

(4700 ед/мг белка). По этому показателю исследуемый белок лишь незначительно уступает ксиланазе из *Neocallimastix patriciarum* (4889,9 ед/мг белка), которая относится к числу наиболее активных ферментов этого класса [27].

Кинетические параметры фермента были определены в результате проведения гидролитической реакции с использованием ксилана березы в качестве субстрата. Реакции проводились при оптимальных условиях: pH 5 и 50 °C. K_m и V_{max} имели значения 0,51 мг/мл и 7395,3 мкмоль/мин·мг, соответственно. Полученные данные позволяют утверждать, что исследуемый фермент имеет большее сродство с субстратом (ксилан) по сравнению с ксиланазой из *N. patriciarum*, величина K_m которой равна 0,89 мг/мл.

Характеристики рекомбинантного ХуIP были исследованы также с использованием ксилана березы в качестве субстрата.

Исследования показали, что pH-оптимум рекомбинантной ксиланазы ХуIP равен 5 (рис. 4*a*). Фермент был активен в интервале pH от 3,6 до 9 и сохранял более 50% активности при pH от 4,3 до 6,8. При значениях $pH \leq 3,5$ ферментативная активность не наблюдалась.

Изучение влияния температуры на активность ХуIP показало, что температурный оптимум фермента равен 50 °C, при этом в диапазоне температур от 43 до 65 °C активность фермента составляет не менее 80% (рис. 4*b*).

Эффект pH на стабильность ХуIP был изучен инкубированием фермента в буферных растворах с различными значениями pH при 37 °C в течение 30 мин с последующим измерением остаточной ферментативной активности. Фермент был устойчив в широком pH диапазоне, при этом более 80% активности сохранялось после инкубирования ксиланазы в интервале pH 3 – 9 (рис. 5*a*).

Была изучена устойчивость фермента к высоким температурам: остаточная активность после прогревания очищенного ХуIP при 70, 80 и 90 °C в течение 10 мин составила 26,9, 14,4 и 1%, соответственно (рис. 5*b*).

Белок ХуIP был достаточно устойчив к пищеварительным ферментам. После обработки пепсином и трипсином в соответствующем буфере при 37 °C в течение 30 мин остаточная активность фермента составляла 78 и 82%. (рис. 5*c*).

Рекомбинантный белок ХуIP подвергали воздействию белковых ингибиторов, содержащихся в экстракте зерен ячменя, с последующим измерением остаточной активности фермента (рис. 5*d*). Инкубация в присутствии экстракта зерен ячменя привела к уменьшению активности фермента всего лишь на 9%, что говорит о его достаточно высокой устойчивости к белковым ингибиторам ксиланаз злаков.

Была также исследована активность фермента в присутствии ионов металлов и химических реагентов:

Ион металла	Контроль	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Fe ³⁺	Ni ²⁺	Mn ²⁺	Co ²⁺	Li ⁺	Cu ²⁺	ЭДТА	SDS
Активность, %	100	109	101	124	100	78	100	98	120	119	63	75	65

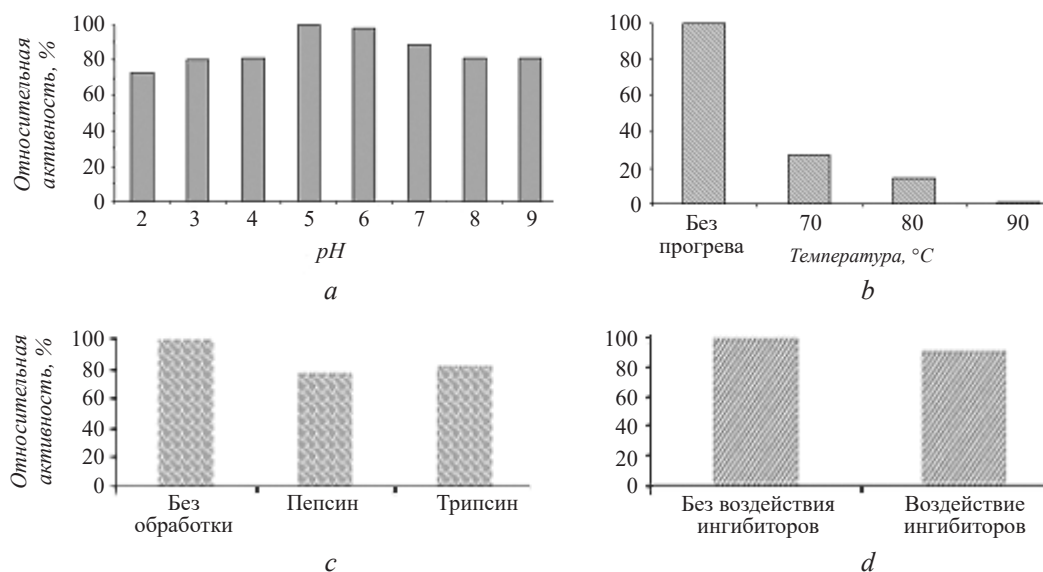


Рис. 5. Изучение pH-стабильности, термостабильности, устойчивости к пищеварительным ферментам и белковым ингибиторам ксиланаз злаков: *a* – pH стабильность; *b* – термостабильность XylIP; *c* – устойчивость XylIP к воздействию пепсина и трипсина; *d* – устойчивость XylIP к воздействию белковых ингибиторов ксиланаз. Приведены средние значения, полученные в результате проведения трех независимых измерений с учетом погрешности измерения ($p < 0,05$)

Fig. 5. Study of pH stability, thermostability, resistance to digestive enzymes and to xylanase protein inhibitors from cereals: (a), pH stability; (b), thermostability of XylIP; (c), resistance of XylIP to pepsin and trypsin; (d), resistance of XylIP to xylanase protein inhibitors from cereals. The average values obtained as a result of three independent measurements, taking into account the measurement error ($p < 0.05$)

Влияние ионов Mg^{2+} , Co^{2+} и Li^{+} проявлялось в увеличении активности фермента соответственно на 24, 20 и 19%. Влияние Fe^{3+} , Cu^{2+} , ЭДТА и СДС приводило к уменьшению активности XylIP соответственно на 22, 37, 25 и 35%. Добавление других ионов металлов не оказывало существенного влияния на активность фермента.

Специфическая активность очищенного фермента XylIP на различных субстратах была измерена при 50 °C и pH 5 в течение 10 мин (табл. 1).

Фермент показал максимальную специфическую активность при использовании ксилана березы в качестве субстрата. Специфическая активность при использовании арабиноксилана была ниже и составила 53,5% от максимального уровня.

Также была выявлена способность XylIP гидролизовать карбоксиметилцеллюлозу и лишенин. Фермент не показал активности на β -глюкане ячменя.

Таким образом, были изучены свойства новой высокоактивной эндо- β -1,4-ксиланазы из анаэробного гриба семейства Neocallimastigomycota *Pyromyces finnis* в экспрессионной системе *P. pastoris*.

Рекомбинантный белок обладает высокой удельной активностью, кинетическими показателями, характерными для высокоактивного фермента, устойчивостью к действию пищеварительных ферментов и ингибиторам ксиланаз злаков. Температурный и pH-оптимум исследуемого фермента составляют 50 °C и pH 5, при этом его

Таблица 1.

Субстратная специфичность очищенного фермента XylIP
Substrate specificity of the purified XylIP enzyme

Субстрат	Специфическая активность, ед/мг белка	Активность, %
Ксилан березы	4700	100
Арабиноксилан	2515	53,5
КМЦ	320	6,8
Лишенин	385	8,2
β -глюкан ячменя	0	0

активность сохраняется на высоком уровне в широком диапазоне pH и температур. Кроме того, фермент способен эффективно гидролизовать арабиноксилан – основной некрахмальный полисахарид, входящий в состав злаков.

Полученные результаты также показывают, что ген *xylP* способен эффективно экспрессироваться в дрожжах *Pichia pastoris*.

Характеристики нового фермента, а также его способность к эффективной экспрессии в *Pichia pastoris* позволяют создавать на его основе рекомбинантные дрожжевые продуценты ксиланазы для использования в кормопроизводстве.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (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. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 1996, 13, 101–131.
- Kulkarni N., Shendye A., Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1999, 23(4), 411–456.
- Liab K., Azadi P., Collins R., et al. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme Microbiol. Technology*, 2000, 27(1–2), 89–94. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00190-3](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00190-3)
- Prade R.A. Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotechnol. Genet. Engineering Rev.*, 1996, 13(1), 101–132.
- 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. Portland: Portland Press. 1993.
- Collins T., Gerday C., Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, 29(1), 3–2. doi: 10.1016/j.femsre.2004.06.005
- Гусаков А.В. Белковые ингибиторы микробных ксиланаз. Обзор. *Биохимия*, 2010, 75(10), 1331–1347. <https://doi.org/10.1134/S0006297910100019>
- Lee S.S., Ha J.K., Cheng K.J. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to in vitro degradation of orchard grass cell walls and their interactions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66(9), 3807–3813. doi: 10.1128/AEM.66.9.3807-3813.2000
- Orpin C.G. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Microbiology*, 1975, 91(2), 249–262.
- Qiu X., Selinger B., Yanke L.J., Cheng K.J. Isolation and analysis of two cellulase cDNAs from *Orpinomyces joyonii*. *Gene*, 2000, 245(1), 119–126. doi: 10.1016/S0378-1119(00)00028-7
- Comlekcioglu U., Akyol I., Ozkose E., et al. Carboxymethylcellulase production by the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix* sp. GMLF7. *Annals Microbiol.*, 2008, 58(1), 115–119
- Tsai C.F., Qiu X., Liu J.H. A comparative analysis of two cDNA clones of the cellulase gene family from anaerobic fungus *Pyromyces rhizinflata*. *Anaerobe*, 2003, 9(3), 131–140. doi: 10.1016/S1075-9964(03)00087-8
- Youssef N.H., Couger M.B., Struchtemeyer C.G., et al. The genome of the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain C1A reveals the unique evolutionary history of a remarkable plant biomass degrader. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013, 79(15), 4620–4634. doi: 10.1128/AEM.00821-13
- Harhangi H.R., Steenbakkers P.J., Akhmanova A., Jetten M.S., van der Drift C., den Camp H.J.O. A highly expressed family 1 β -glucosidase with transglycosylation capacity from the anaerobic fungus *Pyromyces* sp. E2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 2002, 1574(3), 293–303. doi: 10.1016/S0167-4781(01)00380-3
- Ljungdahl L.G. The Cellulase/Hemicellulase System of the Anaerobic Fungus *Orpinomyces* PC2 and Aspects of Its Applied Use. *Annals New York Acad. Sci.*, 2008, 1125(1), 308–321. doi: 10.1196/annals.1419.030 49.
- Borneman W. S., Hartley R. D., Morrison W. H., et al. Feruloyl and p-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1990, 33(3), 345–351. doi: 10.1007/BF00164534 50
- Borneman W.S., Akin D.E., Ljungdahl L.G. Fermentation products and plant cell wall-degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55(5), 1066–1073.
- Li X. L., Skory C.D., Ximenes E.A., et al. Expression of an AT-rich xylanase gene from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2 in and secretion of the heterologous enzyme by *Hypocrea jecorina*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 74(6), 1264–1275. doi: 10.1007/s00253-006-0787-6
- Tsai C.T., Huang C.T. Overexpression of the *Neocallimastix frontalis* xylanase gene in the methylotrophic yeasts *Pichia pastoris* and *Pichia methanolica*. *Enzyme Microbial Technology*, 2008, 42(6), 459–465. doi: 10.1016/j.enzmictec.2008.01.018
- Van Wyk N., Den Haan R., Van Zyl W.H. Heterologous production of NpCel6A from *Neocallimastix patriciarum* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microbial Technology*, 2010, 46(5), 378–383. doi: 10.1016/j.enzmictec.2009.11.005

22. O'Malley M.A., Theodorou M.K., Kaiser C.A. Evaluating expression and catalytic activity of anaerobic fungal fibrolytic enzymes native to *Pyromyces* sp E2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental Progress Sustainable Energy*, 2012, 31(1), 37–46. doi:10.1002/ep.10614
23. Gordeeva T. L., Borschevskaya L. N., Sineoky S. P. Improved PCR-based gene synthesis method and its application to the *Citrobacter freundii* phytase gene codon modification *Journal Microbiological Methods*, 2010, 81(2), 147–152.
24. Калинина А.Н., Гордеева Т.Л., Синеокий С.П. Экспрессия гена ксиланазы из *Paenibacillus brasiliensis* X1 в *Pichia pastoris* и характеристика рекомбинантного белка. *Биотехнология*, 2018, 34(6), 22–32. doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-22-32
25. Юркевич В.В. Малый практикум по биохимии. Москва, Изд-во МГУ, 1979, 159–175.
26. Miller G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, 1959, 31(3), 426–428
27. Cheng Y.S., Chen C.C., Huang C.H., et al. Structural analysis of a glycoside hydrolase family 11 xylanase from *Neocallimastix patriciarum* Insights into the molecular basis of a thermophilic enzyme. *J. Biol. Chem.*, 2014, 289(16), 11020–11028. doi: 10.1074/jbc.M114.550905
28. Cereghino J.L., Cregg J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2000, 24(1), 45–66. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x

Expression of Xylanase Gene from *Pyromyces finnis* in *Pichia pastoris* and Characterization of Recombinant Protein

A.N. KALININA^{1,*}, L.N. BORSCHEVSKAYA¹, 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: anna.kalininaa@yandex.ru

Received June 07, 2019

Revised June 17, 2019

Accepted July 11, 2019

Abstract—The heterologous expression and characteristics of a new xylanase from *Pyromyces finnis* have been described. The endo-1,4-β-xylanase XylP (EC 3.2.1.8) consists of 223 amino acids and 19 residues of a putative signal peptide in the N-terminal region. The amino acid sequence of the mature protein has the greatest homology with the sequence of the native catalytic N-terminal domain of *Neocallimastix patriciarum* endo-1,4-β-xylanase (84%). A synthetic nucleotide sequence encoding a mature XylP protein was expressed in *Pichia pastoris*. The purified recombinant enzyme showed activity with birch xylan and arabinoxylan. When using birch xylan as a substrate, the optimum pH for the enzyme was 5.0, and the optimum temperature was 50 °C. The specific activity of the xylanase was 4700 U/mg protein, and K_m and V_{max} were equal to 0.51 mg/mL and 7395.3 μmol/(min·mg), respectively. The recombinant XylP protein showed moderate thermal stability and high pH stability, resistance to digestive enzymes and protein inhibitors of grain xylanases. It was also shown that the Mg²⁺, Co²⁺ and Li⁺ ions have a positive effect on the enzyme activity.

Key words: xylanase, xylan, feed enzyme, *Pichia pastoris*, *Pyromyces finnis*.

Funding—The work was performed with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia (Unique Project Identifier RFMEFI60717X0180) using the Unique Scientific Installation – National Bioresource Center «All-Russian Collection of Industrial Microorganisms», NRC «Kurchatov Institute» – GOSNIIGENETIKA

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-24-32