

УДК 577.151

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ЭНДО-КСАНТАНАЗЫ *Thermogutta terrifontis* в *Penicillium verruculosum*: ВЫДЕЛЕНИЕ И ПЕРВИЧНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТА

© 2021 Ю.А. Денисенко^{1*}, О.Г. Короткова¹, И.Н. Зоров^{1,2}, А.М. Рожкова^{1,2},
М.В. Семенова¹, А.Г. Ельченинов¹, И.В. Кубланов¹, А.П. Сеницын^{1,2}

¹ Федеральный исследовательский центр «Основы фундаментальной биотехнологии»
Российской академии наук, 119071 Москва, Россия; электронная почта: denisenko.yura@mail.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.11.2020

После доработки 29.12.2020

Принята к публикации 29.12.2020

С помощью экспрессионной системы на основе реципиентного штамма *Penicillium verruculosum* 537 (DniaD) и промотора гена целлюбиогидролазы 1 был создан штамм-продуцент гетерологичной эндо-ксантаназы из термофильного планктомицета *Thermogutta terrifontis*. Методами жидкостной хроматографии была выделена гомогенная эндо-ксантаназа с молекулярной массой 23,7 кДа (pI 6,5). Фермент обладал способностью к деструкции ксантана, а также проявлял активность по отношению к КМ-целлюлозе, β-глюкану, курдлану, лихенану, ламинарину, галактоманнану, ксилоглюкану и не гидролизовал *n*-нитрофенильные производные β-D-глюкозы, маннозы и целлобиозы. Температурный оптимум эндо-ксантаназы составил 55 °С, оптимум pH – 4,0; фермент проявлял 90% от максимальной активности в диапазоне температуры 50–60 °С и pH 3–5.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эндо-ксантаназа, *Thermogutta terrifontis*, *Penicillium verruculosum*, гетерологичная экспрессия, деструкция ксантана.

DOI: 10.31857/S0320972521040096

ВВЕДЕНИЕ

Ксантан (ксантановая камедь) является внеклеточным гетерополисахаридом, который продуцируют бактерии *Xanthomonas campestris*. Основная цепь ксантана состоит из связанных β-1,4-глюкозидной связью остатков глюкозы, боковые группы состоят из трех остатков: α-D-манноза (2 → 1)-β-D-глюкуроновая кислота (4 → 1)-β-D-манноза у каждого второго остатка глюкозы в положении C3 [1] (рис. 1), при этом проксимальный и дистальный маннозильные остатки боковой цепи часто являются ацетилированными или содержат пируватные группы.

Молекулярная масса (ММ) ксантана составляет 1–7×10⁶ Да. Степень полимеризации и ацетилирования ксантана может варьировать в зависимости от условий культивирования *X. campestris*.

Принятые сокращения: КЖ – культуральная жидкость; ММ – молекулярная масса; *n*НФ – *para*-нитрофенильные производные; п.н. – пар нуклеотидов; ФП – ферментный препарат; ЭК – эндо-ксантаназа.

* Адресат для корреспонденции.

Водные растворы ксантана образуют гелеобразную структуру. При растворении ксантан может быть неупорядочен, но чаще склонен к образованию упорядоченных структур, наиболее простая из которых – спираль главной цепи, вокруг которой выстраиваются боковые группы.

Раствор ксантана обладает свойством псевдопластичности (вязкость раствора уменьшается при увеличении напряжения сдвига). Благодаря этим качествам ксантановая камедь нашла применение в таких отраслях, как нефтедобыча, пищевая и косметическая промышленность [2, 3]. Основной объем ксантана используется при бурении вертикальных и наклонных скважин большого диаметра, а также в процессах интенсификации добычи нефти и природного газа с использованием технологии гидроразрыва пласта, где 0,5–2%-ные растворы ксантана (в том числе в смеси с другими полисахаридами) используются для доставки расклинивающих агентов (проппантов) в тело пласта. Закачиваемые в скважины растворы ксантана характеризуются низким фильтрационным сопротивлением при движении в среде, после завершения прокачки происходит гелеобразование, и вязкость раствора возрастает в сотни раз.

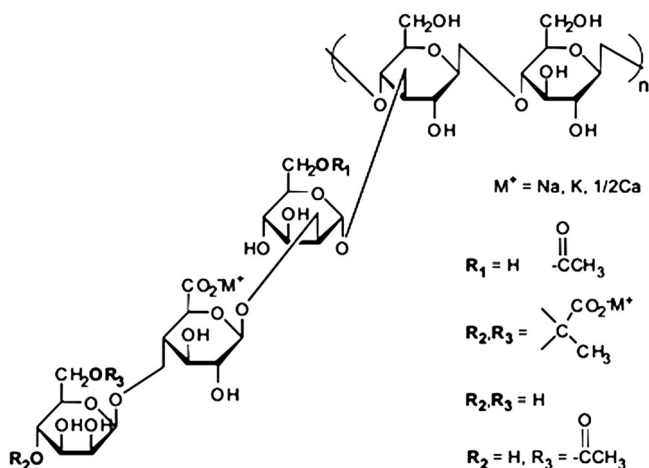


Рис. 1. Структура мономерного звена ксантана

Важно, что вязкость ксантана в стволе скважины должна быть уменьшена после завершения операции гидроразрыва пласта, т.е. ксантан должен быть разрушен до низкомолекулярных сахаров. В настоящее время для этих целей применяются сильные окислители и другие агрессивные компоненты, которые оказывают негативное влияние на окружающую среду при попадании в открытые водоемы, грунтовые воды и отвалы в районе скважин.

Вместо сильнодействующих и вредных для окружающей среды химических веществ для деполимеризации ксантановой камеди целесообразно использовать гидролитические ферменты. Ввиду образования молекулами ксантана упорядоченных структур в водных растворах, необходимо использовать комплекс ферментов, состоящий из ксантан-специфичных эндо-глюканаз (эндо-ксантаназа, ЭК), разрушающих основную полисахаридную цепь ксантана, а также ксантан-лиаз, β -маннозидаз, α -маннозидаз и α -глюкуро니다з, которые расщепляют боковые цепи. Считается, что для эффективного снижения вязкости раствора ксантана необходим комплекс двух совместно функционирующих ферментов, в состав которого входят ЭК и ксантан-лиаза. Ксантан-лиаза катализирует расщепление β -D-маннозил- β -D-1,4-глюкуроноильной связи на боковом радикале ксантана и высвобождает дистальную D-маннозильную группу (ЕС 4.2.2.12) [4].

На сегодняшний день известны бактерии, которые способны к деструкции ксантана за счет экспрессии ксантан-литических ферментов, например, *Cellulomonas* sp. LX [5] и *Bacillus* sp. [6]. Термофильный планктомицет *T. terrifontis*, который был выделен из горячих источников на Дальнем Востоке, способен рас-

ти на ксантановой среде в аэробных и анаэробных условиях [7]. Кроме того, транскриптом этой бактерии, помимо ЭК, имеет в своем составе мРНК нескольких ферментов, которые в соответствии с их субстратной специфичностью способны в комплексе с ЭК приводить к деструкции ксантана, в частности, α - и β -маннозидазы, и другие.

В работе Yang et al. [8] описана ЭК *MiXen Microbacterium* sp. XT11, которая имеет мультидоменную структуру и способна гидролизовать ксантан, находящийся в упорядоченной конформации. Также охарактеризована ЭК PspXan9 из *Paenibacillus nanensis*, которая демонстрирует невысокую активность по отношению к немодифицированному ксантану и способна эффективно гидролизовать только модифицированный ксантан – обработанный ксантан-лиазой [9].

Создание эффективных и экологичных ферментных препаратов (ФП) на основе ЭК, способных снижать вязкость растворов ксантана, представляет интерес для нефтедобывающей и других отраслей промышленности. В связи с этим целью данной работы было использование экспрессионной системы гриба *P. verruculosum* для клонирования гена гетерологичной эндо-ксантаназы термофила *T. terrifontis*, выделение и первичная характеристика новой ЭК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы. Гриб *P. verruculosum* 537 (*DniaD*) был использован в качестве ауксотрофного штамма-реципиента, дефектного по гену *niaD*, кодирующему нитратредуктазу. Клетки термофильного планктомицета *T. terrifontis* R1(T) служили источником геномной ДНК [10].

Субстраты. Для измерения активности использовали следующие субстраты: ксантан (ксантановая камедь из *X. campestris*), Na соль карбоксиметилцеллюлозы (KM-целлюлоза), глюкуроноксилан бука (ксилан), *n*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид, *n*-нитрофенил- β -D-маннопиранозид, целлобиоза («Sigma-Aldrich», США); ксантан нефтяной («TNJ», КНР); ксиллоглюкан, галактоманнан, β -глюкан ячменя, ламинарин, лихенан, курдлан («Megazyme», Ирландия).

Прочие реактивы. Для приготовления реактивов Шомоди–Нельсона, Лоури и буферных растворов использовали реактивы классификации х.ч., ч.д.а. и о.с.ч. производства «АО Реахим» и «Хеликон» (Россия), «MP Biomedicals» (Франция), «Applichem» (Испания) и «Sigma-Aldrich» (США).

Для культивирования рекомбинантного штамма *P. verruculosum* использовали глюкозу («Хеликон», Россия), пшеничные отруби («Энзим», Украина), микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ) («МК-Центр», Россия), дрожжевой экстракт («Lesaffre», Франция). В качестве минеральных компонентов питательных сред применяли реактивы производства «Лабтех», «АО Реахим», «Химмед» (Россия), «MP Bio-medicals» и «Sigma-Aldrich» (США).

Ферменты. Для измерения вязкости растворов ксантана использовали ксантан-лиазу *Bacillus* sp. GL1, ЕС 4.2.2.12 («Megazyme», Ирландия).

ПЦР и получение генетических конструкций. Для ПЦР был использован амплификатор С1000 Touch («Bio-Rad», США). Для амплификации гена *thte_1561*, кодирующего ЭК DUF1080, использовали в качестве матрицы геномную ДНК, выделенную из термофильного планктомицета *T. terrifontis* R1(Т). Для ПЦР применяли Phusion ДНК-полимеразу («Thermo Scientific», США). Полученный ПЦР-продукт был клонирован методом независимого лигирования [11]. Далее ПЦР-продукт и линейаризованный вектор рUC-СВН1 обрабатывали Т4 ДНК-полимеразой в присутствии дезоксиаденозинтрифосфата (dATP) и дезокситимидинтрифосфата (dTTP) соответственно («Thermo Scientific», США). Лигирование вставки (150 нг) и вектора рUC-СВН1 (50 нг) проводили путем их смешивания и инкубирования; затем смесь трансформировали клетки *E. coli* Mach1 («Invitrogen», США) по стандартному протоколу [12]. Котрансформация штамма-реципиента *P. verruculosum* 537 (Δ niaD) была проведена по адаптированной методике, описанной Алексенко и соавт. [13].

Скрининг клонов. Первичный скрининг с грибных колоний на наличие целевого гена осуществляли с использованием ДНК-полимеразы Phire Hot Start («Thermo Scientific», США) по исходным праймерам. Клоны *P. verruculosum* с подтвержденной вставкой целевого гена культивировали в колбах Эрленмейера при 30 °С в течение 6 сут. В состав среды входили следующие компоненты (в г/л): МКЦ — 40, пшеничные отруби — 10, дрожжевой экстракт — 10, KH_2PO_4 — 15, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,3, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,3. Отбор клонов осуществляли по результатам проведения Ds-Na-ПААГ-электрофореза полученной при их культивировании культуральной жидкости (КЖ). Электрофорез проводили на приборе Mini-PROTEAN Tetra Cell («Bio-Rad Laboratories», США). В качестве маркеров для электрофореза использовали смесь белков №26612 («Thermo Scientific»,

США). Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури [14].

Наработка ферментных препаратов. Культивирование рекомбинантных штаммов для наработки ФП проводили в однолитровых ферментерах КФ-104/3 («Проинтех», Россия) с использованием следующего состава среды (в г/л): глюкоза — 57,1, МКЦ — 40, пшеничные отруби — 10, кукурузный экстракт — 30, мочевины — 2,5, KH_2PO_4 — 14, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 10, CaCl_2 — 0,6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,6 при 32 °С, pH 5,0 в течение 144 ч. По окончании грибную биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (30 мин, 4200 g, 4 °С) на приборе Avanti J6 («Beckman Coulter», США), после чего среда была обезвожена в распылительной сушилке Mini Spray Dryer B-290 («Buchi», Швейцария).

Выделение и очистка целевого белка. Выделение проводили с использованием системы для белковой хроматографии АКТА Purifier UPC 100 («GE Healthcare», Швеция). Процесс выделения состоял из следующих стадий: осаждение 70%-ным раствором сульфата аммония, перерастворение и обессоливание ФП на колонке с носителем Bio-Gel P2 («Bio-Rad», США), уравновешенной с 0,01 М буфером Bis-Tris/HCl, pH 7,3. Анионообменную хроматографию ФП проводили на колонке, заполненной носителем Source 15Q («GE Healthcare», США), уравновешенной с таким же 0,01 М буфером Bis-Tris/HCl, pH 7,3. Гидрофобную хроматографию проводили на колонке с носителем Source 15ISO («GE Healthcare», США), уравновешенной с 0,05 М Na-ацетатным буфером, pH 5,0, в присутствии 1,7 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Фракции с целевым ферментом обессоливали на колонке с носителем Bio-Gel P2, уравновешенной с 0,05 М Na-ацетатным буфером, pH 5,0.

Идентификация целевого белка. Масс-спектрометрический анализ проводили в ЦКП «Прикладные биотехнологии» ФИЦ Биотехнологии РАН на приборе UltrafleXtreme II («Bruker Daltonics», Германия). Пептидные фрагменты анализировали с помощью программы Mascot («Matrix Science», Великобритания, доступна по ссылке <http://www.matrixscience.com>), а также онлайн-сервисов PeptideMass и FindPept (<https://www.expasy.org>).

Определение активности ферментов. Активность по отношению к полисахаридным субстратам определяли по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров (ВС) при 50 °С и pH 5,0. Концентрацию ВС определяли методом Шомоди–Нельсона [15], погрешность которого составляет 5–10%.

Активность по отношению к *n*-нитрофенильным производным (*n*НФ-) сахаров опреде-

ляли по скорости образования *n*-нитрофенола при 40 °С и рН 5,0 [16]. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль продукта за 1 мин [16].

Определение температурного и рН-оптимума активности ФП и очищенных ферментов. При измерении рН-зависимости активности использовали лихенан и 0,1 М цитрат-фосфатный буфер (рН 3,0–8,5). Температурный профиль активности определяли в диапазоне 30–85 °С с шагом 5 °С при рН 5,0. Оптимальным считали интервал значений рН или температуры, в котором наблюдалось не менее 85% максимальной активности.

Влияние индивидуальных ферментов на изменение вязкости растворов ксантана. Сначала готовили 1%-ный раствор ксантана путем суспендирования порошка ксантана в течение ночи при комнатной температуре на магнитной мешалке в 0,02 М Tris-HCl буфере, рН 7,3. Далее разбавляли тем же буфером в присутствии 2 мМ CaCl₂ до необходимой концентрации (0,1% ксантана) и перемешивали. К 15 мл рабочего раствора ксантана добавляли 0,5 мл буфера или фермента, перемешивали и инкубировали в термостате при 60 °С в течение 65 ч. Измерение вязкости проводили на ротационном вискозиметре DV2TLV («Brookfield», США) с термостатируемой ячейкой, управление прибором и обработку результатов проводили при помощи программы Rheocalc T («Brookfield», США). Относительная погрешность измерения в ходе трехкратного повторения составила 4%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение генно-инженерных конструкций, трансформация штамма-реципиента. С помощью методов генной инженерии был амплифицирован ген *thte_1561* (GenBank ASV74163.1) длиной 642 пары нуклеотидов (п.н.) при использовании LPM ДНК-полимеразы и пары праймеров на целевой ген, кодирующий ЭК DUF1080 (UniProt A0A286RDZ9). Амплификацию проводили методом ПЦР с геномной ДНК *T. terrifontis* R1(T). После выделения ПЦР-продукта из агарозного геля его лигировали с линейаризованным вектором pUC-SVNI.

Полученная плаزمиды была клонирована в компетентные клетки *E. coli* Mach1 для наработки генетического материала. После выделения и очистки плазмидной ДНК была проведена котрансформация штамма-реципиента *P. verruculosum* 537 (Δ*niaD*). Для первичного скрининга было отобрано 80 клонов, которые были пересеяны на твердую селективную среду, содержащую 10 мМ нитрата натрия в качестве источника азота. Скрининг грибных колоний был проведен с помощью ДНК-полимеразы Phire Hot Start и соответствующих праймеров. Было установлено, что 93% клонов содержали необходимый ген длиной 642 п.н. В качестве контроля использовали геномную ДНК *T. terrifontis* R1(T).

Культивирование рекомбинантных штаммов. Отобранные на селективной среде и содержащие целевой ген *thte_1561* клоны были культивированы в колбах Эрленмейера со стандартной

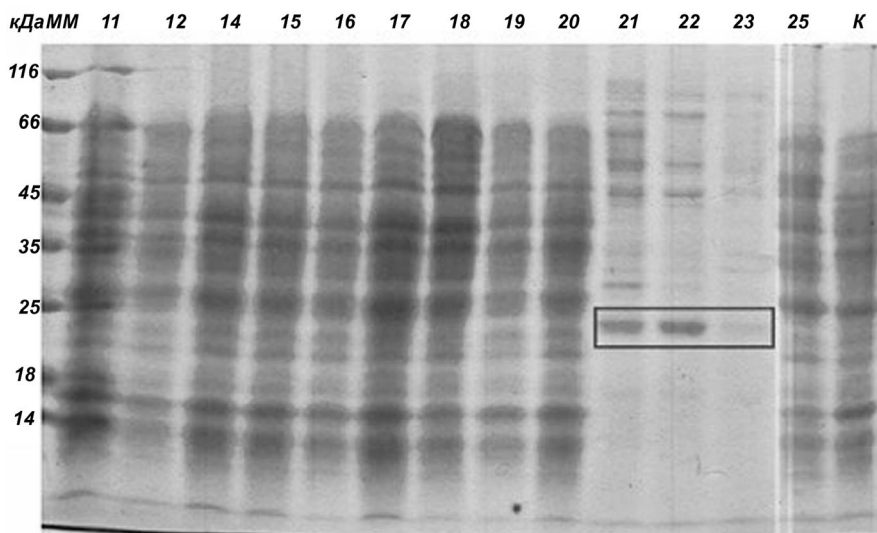


Рис. 2. Электрофореграмма КЖ после 6 сут. культивирования в колбах Эрленмейера. М – маркеры, слева по вертикали указаны ММ стандартных белков (кДа); К – реципиентный штамм *P. verruculosum* 537 (контроль). Сверху по горизонтали указаны номера КЖ (номер КЖ соответствует номеру культивируемого клона)

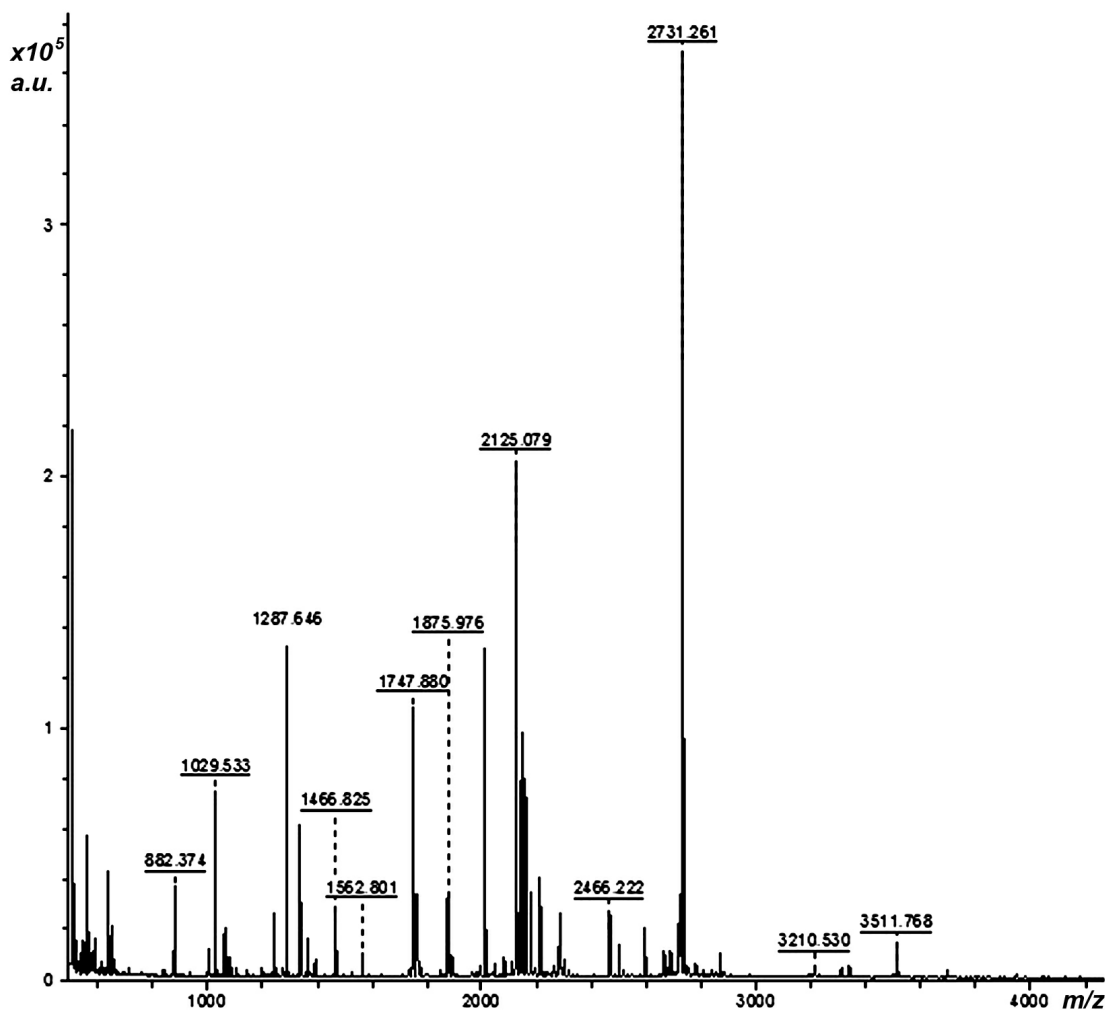


Рис. 3. Масс-спектр образца ЭК, зарегистрированный на приборе UltrafleXtreme II (a.u. – относительные единицы, m/z – приведенная масса)

жидкой питательной средой для *P. verruculosum*. На шестые сутки был проведен Ds-Na-ПА-АГ-электрофорез белковых фракций, а также измерены рН и концентрация белка в КЖ. При разделении белковых фракций по массе удалось выявить ряд клонов, экспрессирующих фермент с видимой ММ 24 кДа, которая соответствует теоретической ММ целевой ЭК – 23,7 кДа. На рис. 2 приведен пример электрофореграммы КЖ ряда клонов.

Полосы, соответствующие ЭК в КЖ № 21, 22 и 23, выделены рамкой на рис. 2. Контрольная электрофореграмма лабораторного штамма *P. verruculosum* 537 представлена в крайнем правом треке. С помощью программного обеспечения Gel Analyzer 2010a была проведена количественная оценка экспрессии ЭК. Она составила от 33 до 45% от общего содержания ферментов, т.е. 1,6 и 2,7 мг/мл в случае КЖ №21 и 22 соответственно.

Белковые полосы, соответствующие ЭК, были вырезаны из геля и обработаны трипсином, гидролизаты подвергали MALDI-TOF масс-спектрометрическому анализу (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry). Результат представлен на рис. 3.

Анализ данных масс-спектрометрии проводили с помощью онлайн-сервиса FindPept и программы flexAnalysis. Массы 22-х полученных пептидов (1029,5; 1244,5; 1287,6; 1338,7; 1392,7; 1466,8; 1562,8; 1747,9; 1876,0; 2009,0; 2048,1; 2125,1; 2144,0; 2176,0; 2466,2; 2500,2; 2594,3; 2731,2; 3195,5; 3210,5; 3511,8; 3696,9 Да) соответствовали ММ теоретических пептидов после специфического трипсинолиза ЭК с погрешностью 100 ppm (point per million). Выравнивание последовательностей пептидов и аминокислотной последовательности зрелого белка ЭК показало 69,5% сходства; на последовательности ЭК ниже идентичные участки отмечены серым:

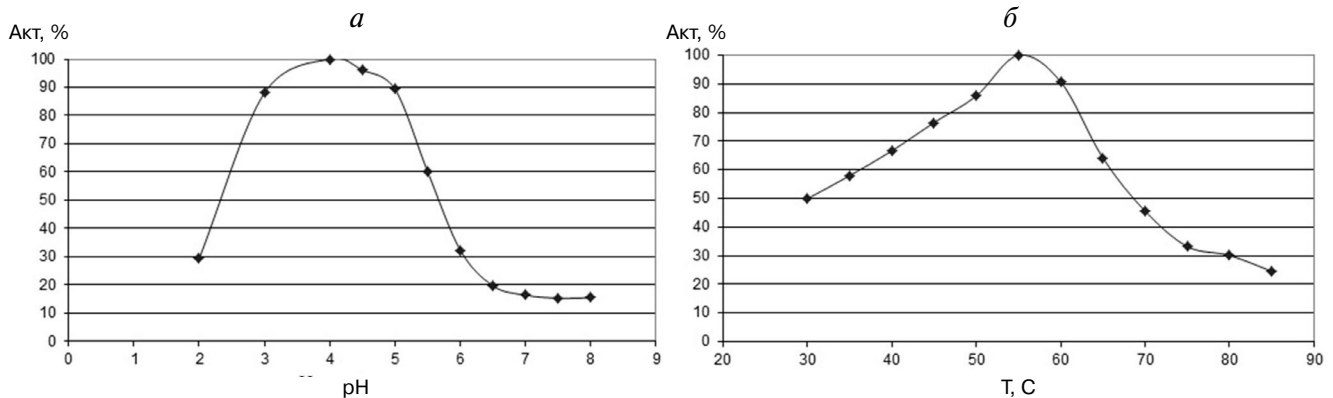


Рис. 4. а – Зависимость активности ЭК от рН (при 50 °С); б – зависимость активности ЭК от температуры (при рН 5,0)

MKLLVAVTEMFVLAVSLNLLYGTCVGAEE-
FRGKWKPLWDGKTFKGWHTIGVG-
TWTIEDGAIVGRKKAEEKEFGHLVSD-
DVKDFVRLKFKVLQGN SGFYFRVEEK-
GYSGVSGFQAEIAPDANTGGLYETN-
GRAWVVQPSPEVVKKAFKPNEWNEMI-
VAAKGGDITVWVNGVKTAEVKNDPGR-
REGHFALQLHGGNDMLVMFKDIKILEPEE

Таким образом, масс-спектрометрические данные подтвердили экспрессию бактериальной ЭК DUF1080 *T. terrifontis* в грибном штамме-реципиенте *P. verruculosum* 537.

Активность выделенной гомогенной ЭК по отношению к разным субстратам (50 °С, рН 5,0)

Субстрат	Тип связи в основной цепи	Активность, ед./мг
Ксантан	$\beta(1,4)$	0,12
КМ-целлюлоза	$\beta(1,4)$	0,58
Ксилоглюкан	$\beta(1,4)$	0,18
Галактоманнан	$\beta(1,4)$	0,12
β -глюкан ячменя	$\beta(1,3)/\beta(1,4)$	0,56
Ламиарин	$\beta(1,3)/\beta(1,6)$	0,17
Лихенан	$\beta(1,3)/\beta(1,4)$	1,48
Курдлан	$\beta(1,3)$	0,12
Целлобиоза	$\beta(1,4)$	<0,01
<i>n</i> НФ- β -целлобиозид	$\beta(1,4)$	<0,002
<i>n</i> НФ- α -D глюкозид	$\alpha(1,4)$	<0,002
<i>n</i> НФ- β -D глюкозид	$\beta(1,4)$	<0,002
<i>n</i> НФ- α -D маннозид	$\alpha(1,4)$	<0,002
<i>n</i> НФ- β -D маннозид	$\beta(1,4)$	<0,002
<i>n</i> НФ- β -D глюкуроид	$\beta(1,4)$	<0,002

По результатам культивирования в колбах был выбран клон №21, который далее культивировали в однолитровых ферментерах КФ-104/3. КЖ после ферментации была обезвожена на распылительной сушилке Mini Spray Drier B-290 («Buchi», Швейцария) с получением сухого ферментного препарата ЭК. Для выделения ЭК в гомогенном виде полученный ФП растворяли в стартовом буфере Tris-HCl, рН 7,3, центрифугировали и обессоливали. Обессоленный ФП фракционировали путем анионообменной хроматографии – ЭК не связывалась с носителем и элюировалась в несвязавшейся фракции. В ходе гидрофобной хроматографии ЭК также элюировалась в несвязавшейся фракции. Анализом MALDI-TOF было подтверждено выделение именно бактериальной ЭК *T. terrifontis*.

В итоге благодаря двум последовательным стадиям хроматографического разделения из ФП была выделена целевая бактериальная ЭК в гомогенном виде с чистотой > 98% (по данным Ds-Na-ПААГ-электрофореза).

Свойства гомогенной ЭК. Активность ЭК была измерена по отношению к ряду субстратов (таблица). Определение субстратной специфичности продемонстрировало, что помимо ксанта, исследуемая ЭК проявляла активность по отношению к ряду полисахаридов, имеющих β -1,4 и β -1,3/ β -1,4-связи (КМ-целлюлоза, ксилоглюкан, галактоманнан, β -глюкан, ламинарин, лихенан, курдлан). Максимальная активность наблюдалась по отношению к лихенану. Активности по отношению к *n*НФ α - и β -глюкозидов детектировано не было. Следует отметить, что активность выделенной ЭК по отношению к ксантану оказалась сопоставима с активностью ЭК PspXan9 *P. nanensis*, составляющей 0,285 ед./мг (по отношению к нативному ксантану) [9].

Для определения температурного и pH-оптимума активности ЭК в качестве субстрата использовали лихенан, поскольку по отношению к нему наблюдалась максимальная активность (рис. 4).

Температурный оптимум ЭК составил 55 °С, pH-оптимум – 4,0. Фермент проявлял 90% от максимальной активности в диапазоне температур 50–60 °С и pH 3–5; 30% активности – при значениях pH 2 и 6 и температуре 80 °С.

Влияние ЭК на вязкость растворов ксантана.

Как известно, ксантан-лиаза является одним из ферментов, способных модифицировать ксантан. В данной работе использовали фермент *Bacillus* sp., штамм GL1, которая является ксантан-лиазой I типа, т.е. специфичной к наличию пируватной группы на дистальном остатке D-маннозы. Было измерено влияние ЭК и ксантан-лиазы на изменение вязкости раствора ксантана поодиночке и совместно. К 15 мл 0,1 и 0,5%-ного раствора ксантана добавляли 0,5 мл

буфера или раствора фермента. Концентрация каждого из ферментов в реакционной смеси составляла 3,25 мкг/мл. Далее раствор перемешивали и инкубировали в термостате при 60 °С в течение 65 ч. Вязкость растворов ксантана с буфером и с ферментами определяли на ротационном вискозиметре. Остаточная вязкость растворов ксантана под действием ферментов представлена на рисунке 5.

Для обеих выбранных концентраций ксантана максимальное уменьшение вязкости наблюдалось в случае совместного использования ксантан-лиазы и ЭК – до 60% от исходной. В одиночку ксантан-лиаза снижала вязкость до 80% от исходной. Гомогенная ЭК также оказалась эффективнее в менее концентрированном растворе ксантана – остаточная вязкость составила 77 и 69% в случае 0,5 и 0,1%-ного раствора соответственно.

При увеличении загрузки фермента в 4 раза остаточная вязкость 0,1%-ного раствора ксанта-

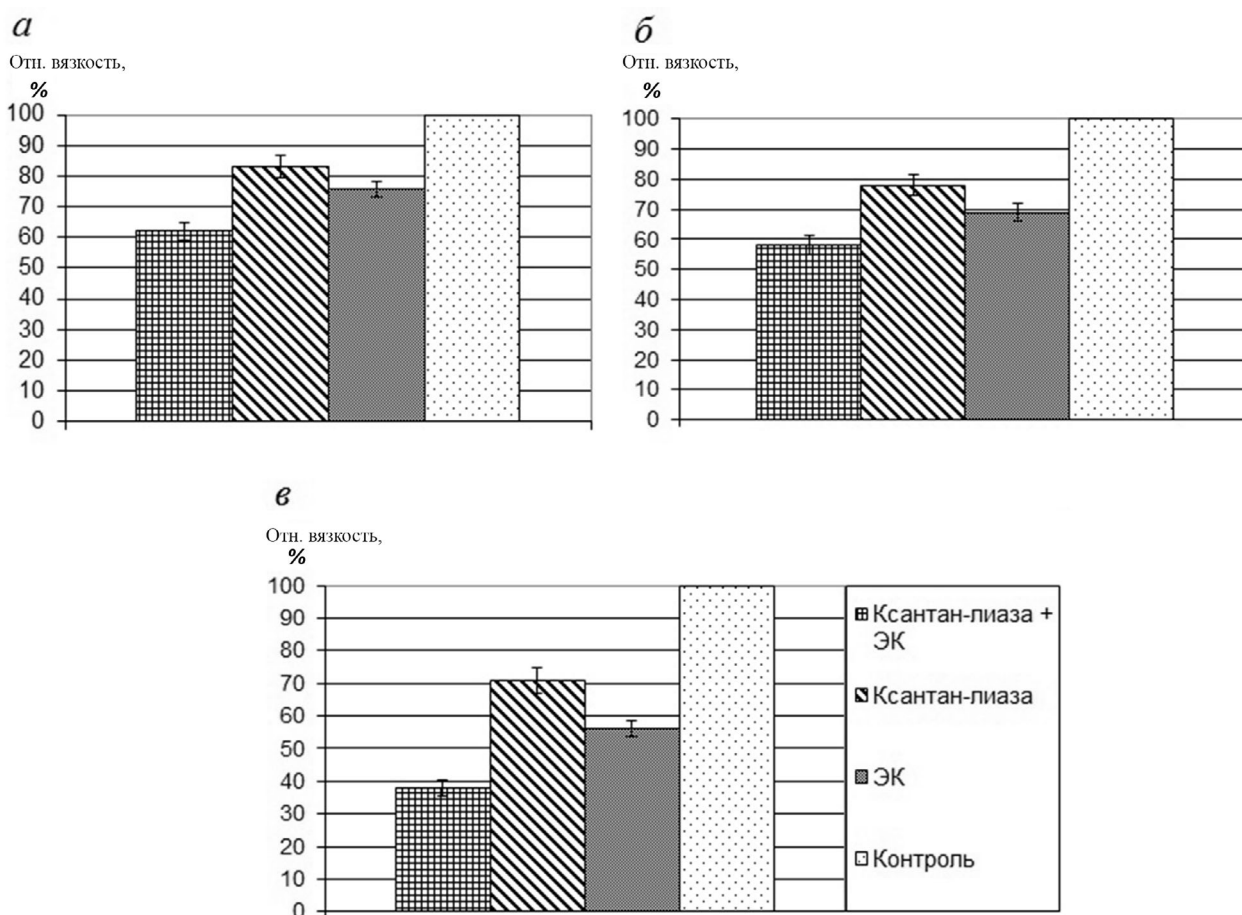


Рис. 5. Относительная остаточная вязкость растворов ксантана после обработки ферментами: ЭК, ксантан-лиазой и совместно двумя ферментами при 60 °С в течение 65 ч. а – 0,5%-ный раствор ксантана при загрузке ферментов в концентрации 3,25 мкг/мл; б – 0,1%-ный раствор при загрузке ферментов в концентрации 3,25 мкг/мл; в – 0,1%-ный раствор при концентрации ферментов 13 мкг/мл

на при добавлении гомогенной ЭК составила 56%, ксантан-лиазы — 71%. Максимальное снижение вязкости 0,1%-ного раствора ксантана наблюдалось в случае совместного действия ферментов. Увеличение концентрации ферментов привело к снижению остаточной вязкости 0,1%-ного раствора с 60 до 38%.

Полученные данные свидетельствуют, что ЭК способна самостоятельно снижать вязкость раствора ксантана в ходе длительного термостабирирования при 60 °С, а добавление ксантан-лиазы *Bacillus* sp. увеличивает эффективность этого процесса.

С помощью экспрессионной системы на основе реципиентного штамма *P. verruculosum* 537 (Δ niaD) и промотора гена целлобиогидролазы I был создан штамм-продуцент эндо-ксантаназы (ЭК, DUF1080) из термофильного планктомицета *T. terrifontis*. Методами хроматографии была получена гомогенная ЭК с ММ 23,7 кДа (pI 6,5). ЭК обладала способностью к деструкции ксантана без добавления вспомогательных ферментов, а также проявляла активность по отношению к КМ-целлюлозе, β -глюкану, курдлану, лихенану, ламинарину, галактоманнану, кси-

логлюкану, но не гидролизовала *n*-нитрофенильные производные β -D-глюкозы, маннозы и целлобиозы. Температурный и pH-оптимум ЭК составил 55 °С и 4,0, фермент проявлял 90% активности от максимальной в диапазоне температуры 50–60 °С и pH 3–5. Таким образом, была показана возможность получения ферментного препарата с эндо-ксантаназой на основе штамма *P. verruculosum* 537 (Δ niaD), способного к деструкции и снижению вязкости растворов ксантана.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Государственное задание 0104-2019-0009).

Благодарности. Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП «Промышленные биотехнологии» и АЦКП «Биоинженерия» ФИЦ Биотехнологии РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Janson, P., Kenne, L., and Lindberg, B. (1975) Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*, *Carbohydr. Res.*, **45**, 275-282, doi: 10.1016/s0008-6215(00)85885-1.
- Santos, V. E., Casas, J. A., and Go, E. (2000) Xanthan gum: production, recovery, and properties, *Biotechnol. Adv.*, **18**, 549-579, doi: 10.1016/s0734-9750(00)00050-1.
- Benny, I. S., Gunasekar, V., and Ponnusami, V. (2014) Review on application of xanthan gum in drug delivery, *Int. J. Pharmtech Res.*, **6**, 1322-1326.
- Nankai, H., Hashimoto, W., Miki, H., Kawai, S., and Murata, K. (1999) Microbial system for polysaccharide depolymerization: enzymatic route for xanthan depolymerization by *Bacillus* sp. strain GL1, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 2520-2526.
- Liu, H., Huang, Ch., Dong, W., Du, Y., Bai, X., and Li, X. (2005) Biodegradation of xanthan by newly isolated *Cellulomonas* sp. LX, releasing elicitor-active xantho-oligosaccharides-induced phytoalexin synthesis in soybean cotyledons, *Process Biochemistry*, **40**, 3701-3706.
- Cadmus, M., Jackson, L., Kermita, A., Burton, E., Plattner, R., and Slodki, M. (1981) Biodegradation of xanthan gum by *Bacillus* sp., *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 5-11.
- Elcheninov, A. G., Menzel, P., Soley Gudbergdottir, R., Slesarev, A. I., Kadnikov, V. V., et al. (2017) Sugar metabolism of the first thermophilic planctomycete *Thermogutta terrifontis*: comparative genomic and transcriptomic approaches, *Front. Microbiol.*, **8**, 2140, doi: 10.3389/fmicb.2017.02140.
- Yang, F., Li, H., Sun, J., Guo, X., Zhang, X., et al. (2019) Novel endotype xanthanase from xanthan-degrading *Microbacterium* sp. strain XT11, *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, doi: 10.1128/AEM.01800-18.
- Moroz, O. V., Jensen, P. F., McDonald, S. P., McGregor, N., Blagova, E., Comamala, G., et al. (2018) Structural dynamics and catalytic properties of a multi-modular xanthanase, *ACS Catal.*, **8**, 6021-6034.
- Slobodkina, G. B., Kovaleva, O. L., Miroshnichenko, M. L., Slobodkin, A. I., Kolganova, T. V., et al. (2014) *Thermogutta terrifontis* gen. nov., sp. nov. and *Thermogutta hypogea* sp. nov., thermophilic anaerobic representatives of the phylum *Planctomycetes*, *Int. J. System. Evol. Microbiol.*, **65**, 760-765, doi: 10.1099/ijs.0.000009.
- Aslanidis, C., and de Jong, P. J. (1990) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR), *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6069-6074.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Aleksenko, A., Makarova, N., Nikolaev, I., and Clutterbuc, K. A. (1995) Integrative and replicative transformation of *Penicillium canescens* with a heterologous nitrate-reductase gene, *Curr. Genet.*, **28**, 474-478.
- Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. (1991) Справочник биохимика, Мир, Москва, с. 544.
- Somogyi, M. (1952) A new reagent for the determination of sugars, *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23.
- Синицын А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. (1995) *Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов*. Учебн. пособие, Изд-во МГУ, Москва, с. 224.

**HETEROLOGOUS EXPRESSION OF ENDO-XANTHANASE
Thermogutta terrifontis IN *Penicillium verruculosum*,
ISOLATION AND PRIMARY CHARACTERIZATION OF THE ENZYME**

**Y. A. Denisenko^{1*}, O. G. Korotkova¹, I. N. Zorov^{1,2}, A. M. Rozhkova^{1,2}, M. V. Semenova¹,
A. G. Elcheninov¹, I. V. Kublanov¹, and A. P. Sinitsyn^{1,2}**

¹ *Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia; E-mail: denisenkoyura@mail.ru*

² *Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Heterologous endo-xanthanase (EX) from the thermophilic planktomycete *Thermogutta terrifontis* strain was obtained using *Penicillium verruculosum* 537 (Δ niaD) expression system with the cellobiohydrolase 1 gene promoter. Homogeneous EX with a molecular weight of 23.7 kDa (pI 6.5) was isolated using liquid chromatography methods. This xanthan degrading enzyme also possesses the enzymatic activity towards CM-cellulose, β -glucan, curdlan, lichenan, laminarin, galactomannan, xyloglucan but not towards *p*-nitrophenyl derivatives of β -D-glucose, mannose and cellobiose. The temperature and pH optima of EX were 55°C and 4.0, respectively; the enzyme exhibited 90% of its maximum activity in the temperature range 50-60°C and pH 3-5.

Keywords: endo-xanthanase, *Thermogutta terrifontis*, *Penicillium verruculosum*, heterologous expression, destruction of xanthan