

УДК 577.151.4

МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ФЕРМЕНТ С ЭНДОГЛЮКАНАЗНОЙ И АЛЬГИНАЗО/ГЛЮКУРОНАН-ЛИАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИЗ БАКТЕРИИ *Cellulophaga lytica*

© 2022 А.В. Лисов^{1*}, С.С. Киселев², Л.И. Трубицина¹, О.В. Белова¹,
Ж.И. Андреева-Ковалевская¹, И.В. Трубицин¹, Т.В. Шушкова¹, А.А. Леонтьевский¹

¹ Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: ssl208@rambler.ru

² Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биофизики клетки РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 18.04.2022

После доработки 30.05.2022

Принята к публикации 30.05.2022

Cellulophaga lytica – граммотрицательная аэробная бактерия, в геноме которой обнаружено множество генов, кодирующих ферменты, расщепляющие полисахариды. Один из ферментов, названный СIGP, содержит домен гликозил-гидролазы семейства GH5 и домен полисахарид-лиазы семейства PL31. Фермент также содержит ТАТ-сигнальный пептид и TIGR04183-домен, что указывает на внеклеточную природу СIGP. Филогенетический анализ показывает, что наиболее близкие к СIGP и содержащие ТАТ-сигнальный пептид и домены GH5, PL31 и TIGR04183 ферменты, широко распространены среди бактерий, принадлежащих к семейству Flavobacteriaceae. СIGP, продуцируемый рекомбинантным штаммом *Escherichia coli*, был очищен и охарактеризован. СIGP демонстрирует эндогликаноазную (ЕС 3.2.1.4) активность и катализирует гидролиз β-D-глюкана, натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ-Na), аморфной целлюлозы, но не кристаллической целлюлозы и ксилана. Продуктами гидролиза КМЦ-Na являются целлобиоза и целлотриоза, при гидролизе β-D-глюкана обнаруживаются глюкоза, целлобиоза, целлотетроза и целлопентоза. СIGP наиболее эффективен с поли-β-D-маннуронатными, чем с поли-α-L-гулуронатными участками альгиновой кислоты. В связи с этим можно предположить, что СIGP является PolyM-лиазой (ЕС 4.2.2.3). СIGP активен по отношению к полиглюкуроновой кислоте, что указывает на его глюкуронан-лиазную активность (ЕС 4.2.2.14). Фермент отличается нейтральным рН-оптимумом, стабильностью в диапазоне рН 6,0–8,0 и невысокой термостабильностью. СIGP эффективно осахаривает два вида бурых водорослей, *Saccharina latissima* и *Laminaria digitata*, что в дальнейшем позволяет использовать его в производстве биотоплива из макроводорослей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: GH5-эндогликаноаза, PL31-альгиназа, мультифункциональный фермент, осахаривание микроводорослей.

DOI: 10.31857/S0320972522060094, **EDN:** AUSTMD

ВВЕДЕНИЕ

Полисахариды – обширная группа полимерных углеводов, входящих в состав клеточных стенок растений, грибов и бактерий, являющихся наиболее распространёнными веществами биосферы. Полисахариды состо-

Принятые сокращения: КМЦ-Na – натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы; МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза; GH – гликозил-гидролаза; PL – полисахарид-лиаза; PolyM, PolyG, PolyGlu – полиманнуроновая, полиглюкуроновая и полиглюкуроновая кислоты соответственно.

* Адресат для корреспонденции.

ят из различных, часто модифицированных (метилованных, ацетилованных, ферулированных и т.д.), сахаров, связанных гликозидной связью [1]. Способностью расщеплять полисахариды обладают различные микроорганизмы, бактерии и грибы, разрушающие клеточную стенку. Микроорганизмы используют различные комбинации ферментов для деградации. Гликозил-гидролазы (GH) катализируют деструкцию гликозидных связей в присутствии воды, а полисахарид-лиазы (PL) расщепляют полисахариды путём негидролитического и неокислительного разрыва угле-

водной цепи [2, 3]. Важную роль в декомпозиции полисахаридов играет процесс окисления. Например, литические полисахарид-монооксигеназы расщепляют гликозидные связи путём включения одного атома окисляющего агента — кислорода — в молекулу субстрата в присутствии подходящего восстановительного агента [4]. Полисахариды также могут подвергаться деструкции гидроксильными радикалами, образующимися при действии лакказы и целлобиозодегидрогеназы [5].

Как гликозил-гидролазы, так и полисахарид-лиазы проявляют широкую субстратную специфичность, что связано с огромным разнообразием структур полисахаридов. На основании сходства последовательностей GH, PL и другие ферменты деструкции полисахаридов подразделяются на различные семейства [6]. Полная информация об углевод-активных ферментах и их классификация представлены в базе данных CAZy (<http://www.cazy.org/>). Ферменты, принадлежащие к одному семейству, могут отличаться субстратной специфичностью [7] и эффективно расщеплять несколько субстратов. Мультифункциональные ферменты, способные катализировать несколько различных реакций, часто встречаются среди ферментов, активных в отношении полисахаридов, в особенности среди гликозил-гидролаз. Мультифункциональность может проявляться двумя способами. Одни ферменты способны взаимодействовать с различными субстратами благодаря особой структуре своего активного центра. Примерами таких ферментов являются целлюлаза-ксиланаза бактерий *Chryseobacterium* sp. или *Clostridium thermocellum* и целлюлаза-маннаназа *Thermotoga maritima* [8–10]. Другие мультифункциональные ферменты содержат в своей молекуле несколько каталитических доменов. Например, бифункциональный фермент с двумя каталитическими доменами *Ruminococcus flavefaciens* проявляет как ксиланазную, так и β -(1,3–1,4)-глюкканазную активность [11]. Наличие нескольких каталитических доменов позволяет расширить каталитические возможности фермента и эффективно взаимодействовать с различными субстратами. В качестве примера можно привести фермент, полученный из метагеномной ДНК, содержащий три каталитических домена и проявляющий α -L-арабинофуранозидазную, ксиланазную и ферулоил-эстеразную активности [12]. Двухдоменный фермент *Bacillus* sp. обладает

пектат-лиазной и метил-эстеразной активностью и принадлежит к двум различным классам ферментов [13].

Cellulophaga lytica — граммотрицательная аэробная бактерия из семейства Flavobacteriaceae, распространённая в литоральной зоне на поверхности водорослей и пляжной грязи [14]. Анализ полного генома этой бактерии выявил наличие десятков генов, кодирующих ферменты, участвующие в расщеплении полисахаридов [15]. Один из ферментов (GenBank ADY28795.1) содержал последовательности каталитических доменов гликозил-гидролазы семейства GH5 и полисахарид-лиазы семейства PL31 (<http://www.cazy.org/b1554.html>). Таким образом, этот фермент потенциально может проявлять мультифункциональность и предположительно способен катализировать расщепление β -(1,4)-глюканов, альгиновой и полиглюкуроновой кислот (<http://www.cazy.org/GH5.html>; <http://www.cazy.org/PL31.html>), что не удивительно, так как *C. lytica* обитает на поверхности водорослей, чья клеточная стенка состоит в основном из этих веществ [16, 17]. В данной работе был получен рекомбинантный штамм *Escherichia coli*, продуцировавший потенциально мультифункциональный фермент из *C. lytica*, были исследованы свойства и биотехнологический потенциал фермента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование штамма и реактивы. *C. lytica* VKM В-1433 (=DSM 7489) был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (<http://www.vkm.ru/index.htm>). Штамм культивировали при 29 °С (рН 7,2) в среде следующего состава (г/литр): дрожжевой экстракт — 1,0; триптон — 1,0; KCl — 0,7; NaCl — 24,7; MgSO₄ × 7 H₂O — 6,3; MgCl₂ × 6 H₂O — 4,6; CaCl₂ × 2 H₂O — 1,2; NaHCO₃ — 0,2.

Приготовление буфера Бриттона–Робинсона. Универсальный 0,3 М буфер Бриттона–Робинсона готовили следующим образом: 0,1 М ортофосфорной кислоты, 0,1 М борной кислоты, 0,1 М уксусной кислоты смешивали, значение рН доводили до нужного раствором 1 М NaOH в воде.

В данном исследовании использовали следующие реактивы: соли, кислоты, щелочи, а также некоторые компоненты среды («PanReas AppliChem», США); дрожжевой экстракт

(«Biospringer», Франция); триптон («VWR Life Science AMRESCO», США); микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) «Avicel PH-101», пектин из цедры цитрусовых, натриевая соль альгиновой кислоты, β -D-глюкан из ячменя, ксилан бука, натриевая соль карбоксиметил целлюлозы (КМЦ-Na) («Sigma-Aldrich», США). Полиманнуоновая (PolyM) и полиглюкуроновая (PolyG) кислоты были синтезированы методом кислого гидролиза альгиновых кислот [18]. Полиглюкуроновую кислоту (PolyGlu) синтезировали из аморфной целлюлозы с помощью системы TEMPO-NaBr-NaClO («Sigma-Aldrich») [19]. Аморфную целлюлозу получали регенерацией микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) фосфорной кислотой [20].

Морские макроводоросли *Saccharina latissimi* и *Laminaria digitata* были собраны в Кандакшском заливе Белого моря в августе 2019 г. Водоросли перед использованием промывали водой и высушивали.

Клонирование, рекомбинантная экспрессия и очистка белка. Ген амплифицировали методом ПЦР с использованием хромосомной ДНК и праймеров Cif1 (GGTACCGGATCCCAATCTCCTGTAGAAAAAC 27) и Cif1 (CTGCAGTCGACCTATTTTTTAACAAATAAAGAACG 27). Праймеры были подобраны при использовании последовательности гена, депонированной в GenBank (NZ_CP009239.1:1037354-1040365). Для создания продуцента на основе клеток *E. coli* M15(pRep4) амплифицированный ген клонировали в векторную плазмиду pQE-30 («Qiagen», Германия), расщеплённую эндонуклеазами рестрикции BamHI и SalI. Скрининг клонов *E. coli*, содержащих рекомбинантные плазмиды, проводили методом ПЦР с использованием универсальных праймеров для pQE30. Затем продукцию белка индуцировали добавлением 0,1 мМ изопропил- β -D-тиогактопиранозид (ИПТГ), после чего клетки инкубировали в течение 18 ч при 18 °C при перемешивании со скоростью 50 об/мин. Клетки осаждали центрифугированием («Beckman», США) 30 мин при 3700 rpm, осадок ресуспендировали в 10 мл 20 мМ фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 0,5 М NaCl и 1 мМ имидазол. После разрушали клетки ультразвуком с использованием прибора Sonicor Q500 («QSonica», США). Затем удаляли клеточный дебрис центрифугированием, и клеточный лизат загружали в колонку HisTrap объёмом 5 мл («GE Healthcare», США), уравновешенную буфером, в котором проводилось ресуспендирование клеток, при скоро-

сти потока 1 мл/мин. Белок элюировали тем же буфером с добавлением 0,3 М имидазола в изократическом режиме при скорости потока 1 мл/мин. После очистки фракции белка диализовали против 50 мМ Tris-HCl-буфера (pH 7,6). Чистоту белка определяли с использованием ДНС-ПААГ-электрофореза в 10%-ном ПААГ.

Определение свойств фермента. Гидролитическую активность фермента в отношении МКЦ, КМЦ-Na, β -D-глюкана и ксилана определяли по образованию восстанавливающих сахаров, образование которых фиксировали с помощью 3,5-динитросалициловой кислоты (ДНС) [21] с использованием глюкозы в качестве стандарта. Одну единицу гидролитической активности (Е) определяли как количество фермента, которое канализует образование 1 мкмоль глюкозы за 1 мин при действии на соответствующий субстрат.

Лиазную активность в отношении пектина, альгиновой кислоты, PolyM, PolyG и PolyGlu определяли методом с использованием тиобарбитуровой кислоты (ТБК) [22]. Образование окрашенного продукта отслеживали спектрофотометрически («Shimadzu», Япония) при длине волны 550 нм. Одну условную единицу активности (yE) определяли как количество фермента, вызывающее изменение оптической плотности на 0,01 Ед. Реакцию проводили в 50 мМ универсальном буфере Бриттона–Робинсона (pH 7,0) [23] при 40 °C и концентрации субстрата – 1%.

Термостабильность и pH-стабильность фермента определяли как остаточную активность после его инкубации при различных температурах или значениях pH. Остаточную активность выражали в процентах; исходную активность фермента принимали за 100%. Термостабильность изучали в 50 мМ универсальном буфере (pH 7,0); концентрация фермента составляла 1 мг/мл. Стабильность pH измеряли в аналогичных условиях, но в диапазоне pH 3,0–9,0. При исследовании pH-стабильности фермент хранили при 5 °C в течение 5 суток в стерильных условиях.

Температурный и pH-оптимум фермента устанавливали в аналогичной буферной системе и при аналогичной концентрации, но результаты представлены в виде относительных активностей, за 100% принято максимальное значение активности.

Концентрацию белка определяли с помощью коэффициента молярной экстинкции, рассчитанного на основе последовательно-

сти белка с помощью программы Vector NTI. Поиск гомологов белков проводили с помощью BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Для анализа были выбраны последовательности, которые имели по крайней мере 95% покрытия и 50%-ный уровень идентичности. Для определения наличия последовательностей сигнальных пептидов использовали программу SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Уровень идентичности обнаруженных гомологов оценивали с помощью алгоритма парного выравнивания белковых последовательностей Нидлмана–Вунша (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

Продукты гидролиза КМЦ-На и β -D-глюкана идентифицировали методом тонкослойной

хроматографии, как описано ранее [24]. Осахаривание водорослей проводили в 50 мМ универсальном буфере (pH 7,0), концентрация водорослей – 2% (w/v), количество белка – 0,5 мг/мл. Водоросли гомогенизировали с помощью мельницы и просеивали через сито с размером ячеек 0,5 мм. Реакцию проводили при 40 °C в течение 24 ч на орбитальном шейкере («Biosan», Латвия). Осахаривание оценивали по образованию восстанавливающих групп методом ДНС и по увеличению оптической плотности при 550 нм при взаимодействии ненасыщенных урановых кислот с ТБК.

Филогенетический анализ. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей, идентифицированных с помощью

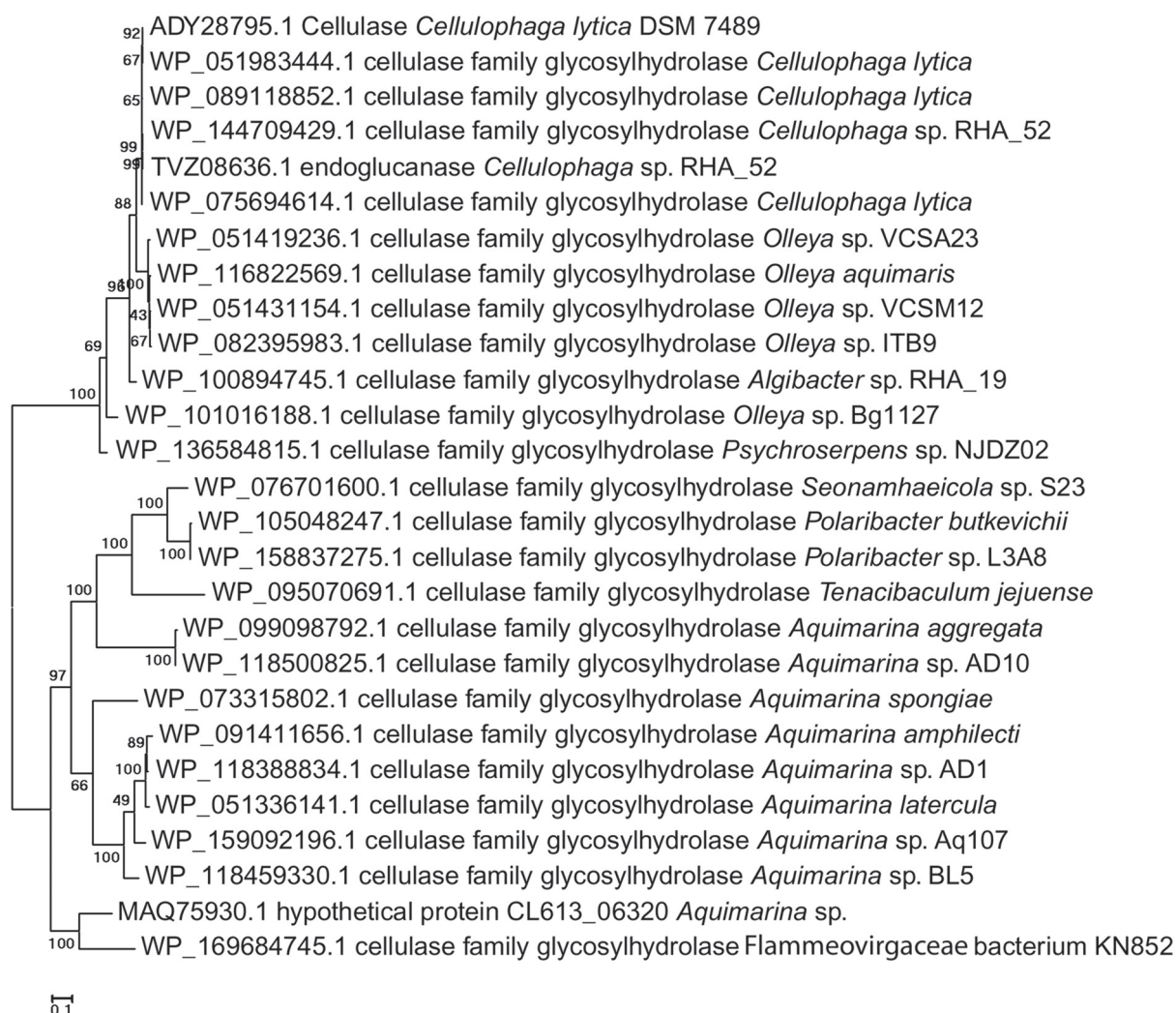


Рис. 1. Филогенетическое дерево для GIGP и его 26 гомологов в разных родах бактерий, построенное методом максимального правдоподобия в программе IQ-TREE. Цифры в узлах указывают значения сверхбыстрого бутстрэп-анализа. Шкала соответствует количеству аминокислотных замен на остаток

BLASTP, проводили с использованием алгоритма MUSCLE [25]. Оптимальную модель замещения определяли с помощью ModelFinder [26], реализованного в программе IQ-TREE (версия 1.6.12) [27]. Филогенетическое дерево было построено на основе множественных выравниваний в программе IQ-TREE с использованием метода максимального правдоподобия. Для получения значений степени ветвления было использовано 1000 реплик [28]. Построенное дерево визуализировали в программе MEGA6 [29].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ген, кодирующий белок ADY28795.1, названный ClGP, был клонирован из геномной ДНК *S. lytica*. Последовательность клонированного гена полностью соответствовала последовательности, депонированной в GenBank. Анализ аминокислотной последовательности белка выявил наличие сигнального пептида TAT (1–27 а.о.), домена семейства GH5 (40–289 а.о.), домена семейства PL31 (337–651 а.о.) и домена TIGR04183 (925–997 а.о.). Наличие пептида TAT и домена TIGR04183, участвующих в системе секреции белка T9SS [30], свидетельствует о том, что ClGP является внеклеточным ферментом. Поиск гомологичных белков с помощью BLAST показал, что его гомологи присутствуют у 26 штаммов бактерий, относящихся к 8 родам: *Cellulophaga* (WP_144709429.1, WP_051983444.1, WP_075694614.1, WP_089118852.1, TVZ08636.1), *Olleya* (WP_051419236.1, WP_116822569.1, WP_051431154.1, WP_082395983.1, WP_101016188.1), *Algibacter* (WP_100894745.1), *Psychroserpens* (WP_136584815.1), *Seonamhaeicola* (WP_076701600.1), *Polaribacter* (WP_105048247.1, WP_158837275.1), *Aquimarina* (WP_073315802.1, MAQ75930.1, WP_091411656.1, WP_118388834.1, WP_051336141.1, WP_159092196.1, WP_118459330.1, WP_099098792.1, WP_118500825.1), *Tenacibaculum* (WP_095070691.1) и бактерии KN852 (семейство Flammeovirgaceae) (WP_169684745.1). Все эти бактерии являются представителями типа Bacteroidetes; 8 родов относятся к семейству Flavobacteriaceae (класс Flavobacteriia, порядок Flavobacteriales), а бактерия KN852 – к семейству Flammeovirgaceae (класс Cytophagia, порядок Cytophagales). При анализе множественного выравнивания, полученного с помощью алгоритма MUSCLE, мы обнаружили, что оптимальная модель аминокислотных замен – это WAG + F + I + G4 [31, 32],

согласно ModelFinder [26].

Эта модель замещения была впоследствии использована для построения филогенетического дерева, представленного на рис. 1.

Все идентифицированные гомологи ClGP были сгруппированы в три группы с высоким уровнем бутстрэп-поддержки (более 95%). Первая группа состоит из 13 белков – 6 – из *Cellulophaga* (включая ClGP), 5 – из *Olleya*, 1 – из *Algibacter*, 1 – из *Psychroserpens*. Вторая группа содержит 12 белков: 8 – из *Aquimarina*, 2 – из *Polaribacter*, 1 – из *Tenacibaculum*, 1 – белок *Seonamhaeicola*. В третью группу входят 2 оставшихся белка из бактерий *Aquimarina* (MAQ75930.1) и Flammeovirgaceae KN852. Уровень идентичности белков первой группы с ClGP при попарном выравнивании по алгоритму Нидлмана–Вунша варьировал в пределах 80,8–99,4%, при этом наиболее высокий уровень был у ферментов *Cellulophaga* (98,7–99,4%).

Наиболее отдаленным гомологом оказался фермент из бактерии Flammeovirgaceae KN852 (44,7% идентичности с ClGP). Выравнивание аминокислотных последовательностей белков из разных родов бактерий показало наличие доменов TAT, GH5, PL31 и TIGR04183, хотя размеры и положение доменов в молекулах различались (рис. 2).

В ходе данной работы был получен рекомбинантный штамм *E. coli* – продуцент фермента ClGP. Продукция белка наблюдалась только для варианта без TAT-сигнального пептида (21 а.о. с N-конца) и без домена TIGR04183 (74 а.о. с C-конца). Белок без TAT-сигнального пептида, но с TIGR04183 не продуцировался. Продукция белка составила 300 мг на литр культуральной жидкости. Фермент был очищен с помощью метода аффинной хроматографии (рис. 3). Молекулярная масса фермента составляла 101 кДа, что хорошо согласуется с массой белка ClGP, рассчитанной на основе его последовательности.

Присутствие домена семейства GH5 свидетельствует о возможной гидролитической активности ClGP. Ферменты этого семейства широко распространены в природе и обладают различной субстратной специфичностью (<http://www.cazy.org/GH5.html>). Многие белки GH5 проявляют эндоглюканазную (ЕС 3.2.1.4) активность [33]. Установлено, что ClGP обладает эндоглюканазной активностью в отношении таких субстратов, как β-D-глюкан, КМЦ-Na, аморфная целлюлоза,

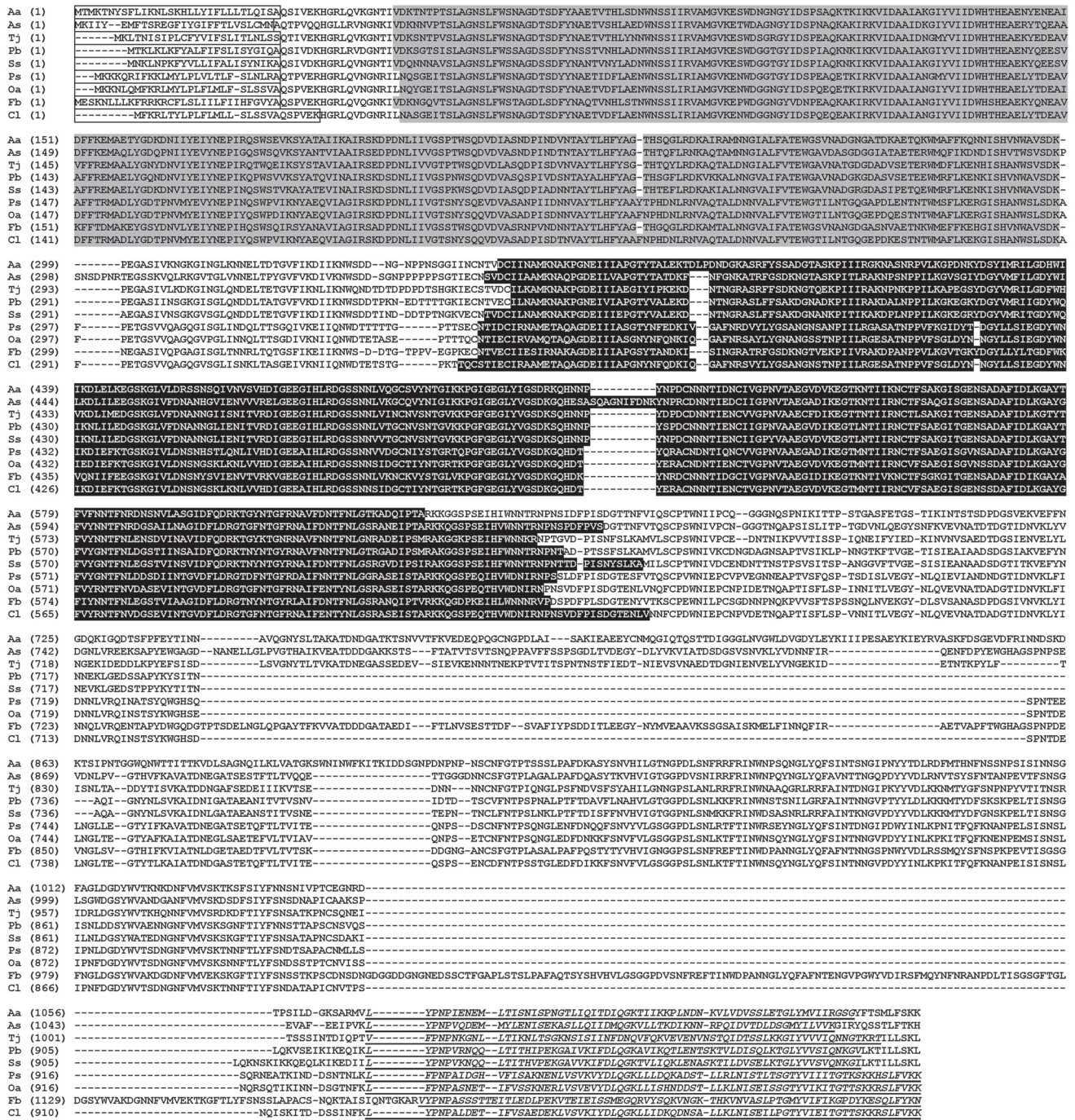


Рис. 2. Выравнивание последовательностей белка из бактерий типа Bacteroidetes. Aa – *Aquimarina aggregata* (WP_099098792.1); As – *Aquimarina spongiae* (WP_07331802.1); Tj – *Tenacibaculum jejuense* (WP_09570691.1); Pb – *Polaribacter butkevichii* (WP_105048247.1); Ss – *Seonamhaeicola* sp. C2-3 (WP_07601600.1); Ps – *Psychroserpens* sp. NJD202 (WP_136584815.1); Oa – *Olleya aquimaris* (WP_116822569.1); Fb – бактерия Flammeovirgaceae KN852 (WP_169684745.1); Cl – *Cellulophaga lytica* (ADY28795.1). Сигнальный пептид TAT находится в рамке. Домен GH5 выделен серым цветом; домен PL6 выделен черным цветом; домен TIGR04183 подчеркнут

но не гидролизует МКЦ и ксилан (таблица).

Продуктами гидролиза КМЦ-Na были целлобиоза и целлотриоза, а β-D-глюкан гидролизовался до глюкозы, целлобиозы, целлотетрозы и целлопентозы (рис. 4).

Согласно CAZy, ферменты с доменом семейства PL31 обладают активностью глюкуро-нан-лиазы (КФ 4.2.2.14) или альгинат-лиазы (КФ 4.2.2.3). СIGP проявлял активность как в отношении альгиновой кислоты, так и в от-

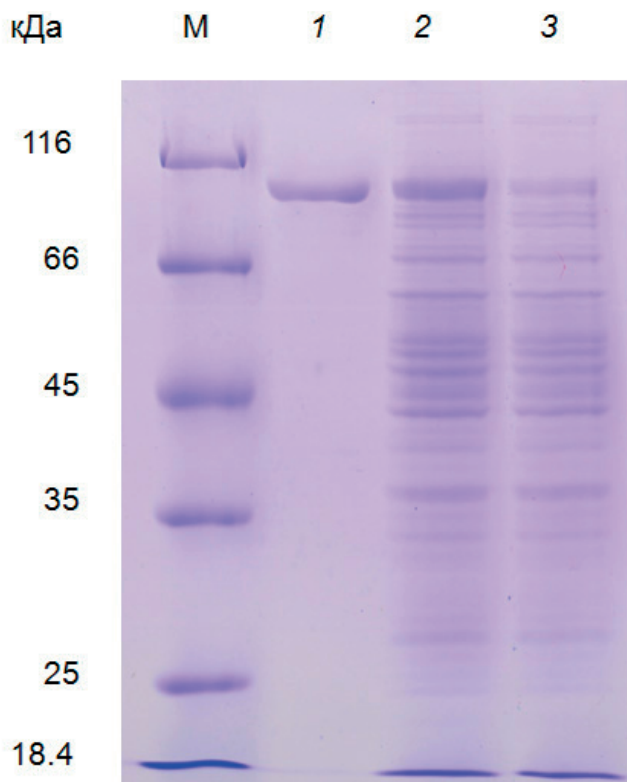


Рис. 3. ДСН-ПААГ-электрофорез CIGP. Дорожки: М – маркеры молекулярной массы; 1 – фермент после очистки; 2 – культура *E. coli* после индукции ИПТГ; 3 – культура *E. coli* до индукции ИПТГ

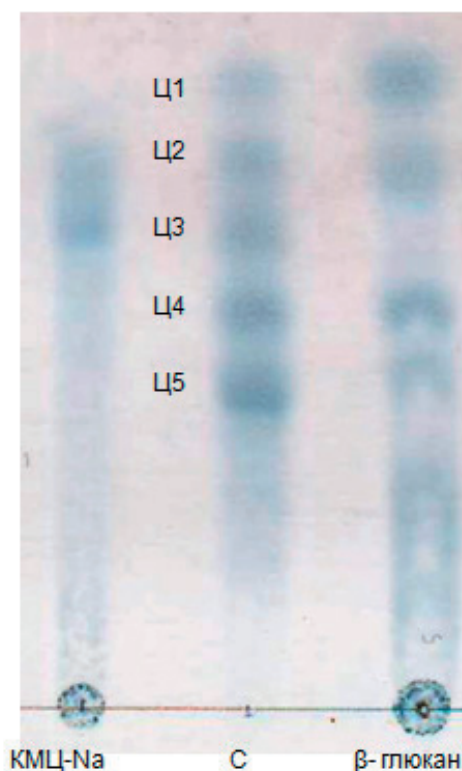


Рис. 4. Продукты гидролиза КМЦ-Na и β-глюкана CIGP, данные ТСХ. С – стандарты: Ц1 – глюкоза, Ц2 – целлобиоза, Ц3 – целлотриоза, Ц4 – целлотетроза, Ц5 – целлопентоза

Субстратная специфичность CIGP

Субстрат	Гидролитическая активность, ед/мг	Лиазная активность, ед/мг
МКЦ	а.о.	—*
β-D-глюкан	2180 ± 104	—
КМЦ-Na	1240 ± 62	—
Аморфная целлюлоза	985 ± 38	—
Ксилан	а.о.	—
Пектин	а.о.	а.о.
Альгиновая кислота	—	240 ± 12
PolyM	—	285 ± 7
PolyG	—	23 ± 1
PolyGlu	—	310 ± 8

Примечание. а.о. – активность отсутствует; * – не определяли.

ношении PolyGlu, поэтому фермент является одновременно глюкуроан-лиазой и альгинат-лиазой. По функциональному признаку в отношении различных блоков альгината лиазы подразделяются на маннуронат-специфичные альгинат-лиазы (PolyM-лиаза, КФ 4.2.2.3)

и гулуронат-специфичные альгинат-лиазы (PolyG-лиаза, КФ 4.2.2.11), а также альгинат-лиазы, активные как в отношении G-, так и в отношении M-блоков [34]. CIGP был активен в отношении PolyM, но проявлял слабую активность в отношении PolyG. Это указывает на то,

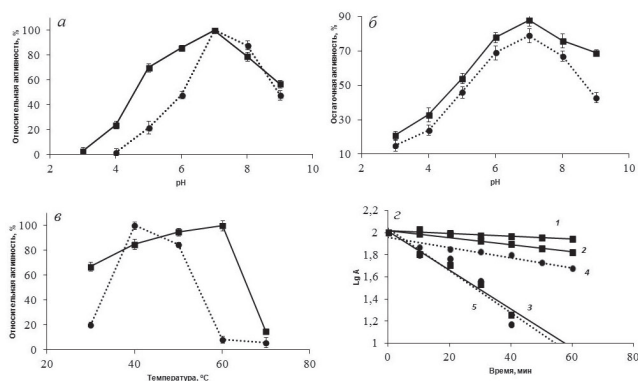


Рис. 5. Свойства гидролитической и лизной активности ClGP. *a* – pH-зависимость активности; *б* – pH-зависимость стабильности; *в* – зависимость активности от температуры; *г* – термостабильность. Сплошная линия – гидролитическая активность: 1 – 40 °C, $k_{app} = 0,001 \text{ мин}^{-1}$; 2 – 50 °C, $k_{app} = 0,003 \text{ мин}^{-1}$; 3 – 60 °C, $k_{app} = 0,018 \text{ мин}^{-1}$. Пунктирная линия – лизная активность: 4 – 40 °C, $k_{app} = 0,005 \text{ мин}^{-1}$; 5 – 50 °C, $k_{app} = 0,019 \text{ мин}^{-1}$

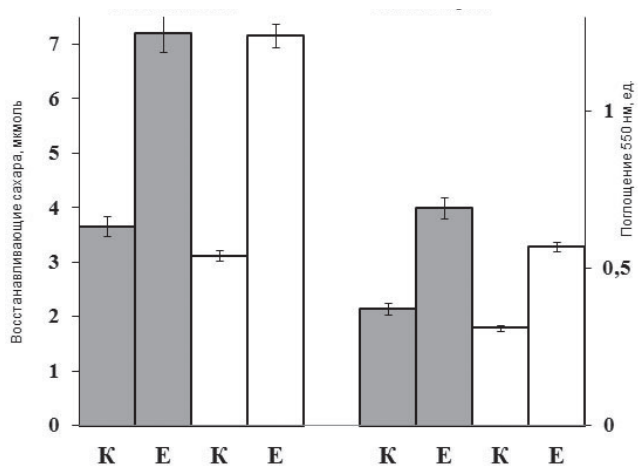


Рис. 6. Осахаривание бурых водорослей рекомбинантным ферментом ClGP. К – контроль; Е – вариант с ферментом. Серые столбики – образование восстанавливающих сахаров, белые столбики – поглощение при 550 нм

что фермент представляет собой PolyM-лиазу. Его слабая PolyG-лиазная активность может быть связана с наличием примесей PolyM-блоков в PolyG в связи со способом приготовления субстратов [18].

Фермент не проявлял лизной активности в отношении пектина. Чтобы выяснить, трансформируются ли полисахариды при гидролитическом и лизном расщеплении в различных активных центрах молекулы фермента, мы изучили трансформацию альгиновой кислоты или PolyGlu в присутствии β -D-глюкана. β -D-глюкан в концентрациях 0,5, 1 и 2 мг/мл не влиял на скорость образования ненасыщенного эфи-

ра уроновой кислоты из альгиновой кислоты и PolyGlu. Это показывает, что гидролитическая и лизная активности ClGP определяются различными активными центрами, что согласуется с наличием доменов GH5 и PL31 в молекуле фермента.

Влияние различных факторов устанавливали отдельно для гидролитической и лизной активности фермента. pH-Оптимум гидролитической и лизной активности ClGP был нейтральным (pH 7); при значениях pH ниже 3–4 – активность не наблюдалась (рис. 5).

При нейтральном значении pH стабильность фермента была выше. ClGP обладал умеренной термостабильностью, но его гидролитическая активность проявляла большую устойчивость к высоким температурам, чем лизная. Гидролитическая активность сохранялась при 50 и 60 °C в течение часа, а лизная активность исчезала при 50 °C в течение 50 мин. Температурный оптимум для лизной активности также был ниже и определялся при 40 °C, а для гидролитической активности – при 60 °C. Различия в термооптимуме и термостабильности могут быть результатом различной стабильности доменов GH5 и PL31.

Макроводоросли являются перспективным источником биомассы, пригодной для производства различных химикатов, в том числе биотоплива [35, 36]. Ферментативная обработка увеличивает содержание сахаров в макроводорослях, что увеличивает выход биотоплива при ферментации [37]. В данной работе исследовали способность фермента осаживать две бурые водоросли в Белом море доминируют именно эти два вида – их биомасса может достигать 5,2 кг/м² [38]. При осаживании макроводорослей ClGP образуются редуцирующие сахара и ненасыщенные уроновые кислоты (рис. 6), что может быть связано как с гидролитическим, так и лизным действием фермента.

Трудно точно оценить вклад гидролитической активности в осаживание, так как при лизном расщеплении полисахаридов также образуются редуцирующие сахара. Тем не менее фермент эффективно осаживал водоросли. Исходная концентрация редуцирующих сахаров и веществ, а также степень осаживания были выше для *S. latissima*. Это может быть связано с различной концентрацией полисахаридов у водорослей, которая варьируется как в зависимости от вида, так и в зависимости от времени года [39].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В этой работе нами был впервые получен и исследован фермент из *C. lytica*, обладающий как эндоглюканазной, так и альгиназной активностью и, таким образом, относящийся одновременно к двум классам ферментов – гидролазам и лиазам. CIGP проявлял эндоглюканазную активность, как и многие другие белки семейства GH5. Как и большинство известных глюканаз семейства GH5, CIGP эффективно гидролизует β -D-глюкан, аморфную целлюлозу, КМЦ-Na, но не был активен в отношении микрокристаллической целлюлозы [40–42]. Как и в случае CIGP, продукты разложения КМЦ-Na и β -D-глюкана эндоглюканазами GH5 представляют собой олигосахариды [43, 44].

CIGP обладал способностью расщеплять компоненты клеточной стенки водорослей – β -(1,4)-глюканы и альгиновую кислоту. Альгиновая кислота является компонентом клеточной стенки бурых водорослей; это линейный сополимер α -L-гулуруновой кислоты (G) и (1–4)-связанных остатков β -D-маннуруновой кислоты [45]. Она может составлять до 40% от общей сухой массы клеточной стенки [46].

Альгинат-лиазы могут расщеплять альгинат на ненасыщенные олигосахариды уроновых кислот путём β -элиминирования гликозидных связей. Эти ферменты широко распространены в природе и выделены из водорослей, моллюсков и большого числа бактерий [35]. Альгиназы принадлежат к разным семействам PL (<http://www.cazy.org/Polysaccharide-Lyases.html>). Но только единственный фермент – альгиназа PsAly из *Paenibacillus* sp., штамм FPU-7, описанный ранее, принадлежал семейству PL31 [47]. Изучены свойства этого фермента и его трёхмерная структура. Как и полученный нами CIGP, PsAly обладает умеренной термостабильностью, нейтральным оптимумом pH и PolyM-лиазной активностью. Хотя большинство альгиназ имеют нейтральный pH-оптимум, существуют ферменты со щелочным или кислым оптимумом [48].

Поскольку CIGP был также активен против PolyGlu, он обладает глюкуронон-лиазной активностью. PolyGlu, как и альгиновая кислота, представляет собой полиуроновою кислоту, состоящую из мономеров глюкуроновой кислоты [49]. Это вещество содержится в клеточных стенках некоторых бактерий, грибов и зелёных водорослей [16]. Глюкуронон-лиазы секретируются бактериями и грибами и при-

надлежат к разным семействам CAZy (<http://www.cazy.org/Polysaccharide-Lyases.html>). Глюкуронон-лиазная активность показана только для двух белков семейства PL31 [50], но тестирование на активность в отношении альгиновой кислоты в этой работе не проводилось. Фактически в большинстве исследований не проверялась активность альгиназ в отношении PolyGlu или активность глюкуронон-лиаз в отношении альгиновой кислоты. Единственным опубликованным примером альгиназы, проявляющей слабую активность в отношении PolyGlu, является фермент Smlt2602 семейства PL17 из *Saccharophagus degradans* [51]. Было показано, что этот фермент активен против блоков G и M альгината. Одна мутация в активном сайте Smlt2602, H208F, снижала активность альгиназы, но значительно увеличивала активность глюкуронон-лиазы. Возможно, различие в специфичности действия этих ферментов связано с особенностями строения активного центра. Однако не ясно, является ли активность CIGP в отношении этих двух субстратов уникальным свойством или это свойство широко распространено среди других глюкуронон-лиаз и альгиназ. Для выяснения этого вопроса необходимы дальнейшие исследования.

Все белки, наиболее близкие к CIGP и содержащие все 4 домена (TAT, GH5, PL31 и TIGR04183), были идентифицированы с помощью BLASTP у бактерий типа Bacteroidetes; подавляющее большинство видов этих бактерий принадлежит к семейству Flavobacteriaceae, и только один вид принадлежит к более отдалённому семейству Flammeovirgaceae (класс Cytophagia). Все эти бактерии были выделены из различных морских сред, большинство из них принадлежит к «морской кладе» Flavobacteriaceae [52]. Примечательно, что некоторые из них связаны с макроводорослями. Постепенное увеличение числа доступных аннотированных геномов позволяет надеяться, что в ближайшем будущем будут идентифицированы новые белки со схожей доменной структурой.

CIGP представляет собой внеклеточный белок, он имеет N-концевой сигнальный пептид и C-концевой домен TIGR04183 систем транслокации белков TAT и T9SS соответственно. Без делеции N- и C-концевых последовательностей продукции белка не на-

блюдалось. После удаления TIGR04183 и TAT молекулярная масса CIGP уменьшалась с 109,2 до 99,5 кДа. Известно, что эффективность продукции белка у *E. coli* может снижаться с увеличением размера белка [53]. При транслокации через мембрану TAT-сигнальный пептид и домен TIGR04183 удаляются, поэтому зрелые белки их не содержат [30, 54]. Есть данные, что наличие TAT-сигнального пептида может приводить к агрегации и снижению активности рекомбинантных белков [55], а также играть важную роль в правильном фолдинге белков [56]. В нашем случае активный фермент был получен без сигнального пептида TAT и домена TIGR04183. Возможно, что эти структуры не участвуют в сворачивании нативной молекулы CIGP.

Чем выше концентрация сахаров в биомассе водорослей, тем выше выход продукта при ферментации [57]. Существуют различные способы повышения концентрации сахаров в биомассе. Одним из них является физико-химическая обработка: нагревание, кислотный и щелочной гидролиз, обработка микроволнами [58]. Другим способом усиления осахаривания является обработка водорослей ферментами, что является более мягким методом по сравнению с физико-химической обработкой [59, 60]. Для этих целей обычно исполь-

зуются либо альгиназы, либо эндоглюканазы, причём совместное использование этих двух типов ферментов существенно увеличивает образование сахаров [61, 62]. CIGP, обладающий одновременно двумя ферментативными активностями и способный к осахариванию водорослей, может замещать сразу два фермента, и поэтому является перспективным кандидатом для биотехнологического использования.

Вклад авторов. А.В. Лисов, А.А. Леонтьевский – концепция и руководство работой, написание и редактирование текста статьи; Л.И. Трубицина, Т.В. Шушкова, О.В. Белова, Ж.И. Андреева-Ковалевская, И.В. Трубицин – проведение экспериментов; С.С. Киселев – обсуждение результатов исследования, работа с базами данных.

Финансирование. Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-07-00899).

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

1. Gorshkova, T. A., Kozlova, L. V., and Mikshina, P. V. (2013) Spatial structure of plant cell wall polysaccharides and its functional significance, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 836-853, doi: 10.1134/S0006297913070146.
2. Stone, B., Svensson, B., Collins, M., and Rastall, R. (2008) Polysaccharide degradation, in *Fraser-Reid BO* (Tatsuta, K., and Thiem, J., eds) Glycoscience, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 2325-2375.
3. Linhardt, R. J., Galliher, P. M., and Cooney, C. L. (1987) Polysaccharide lyases, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **12**, 135-176, doi: 10.1007/BF02798420.
4. Forsberg, Z., Sørli, M., Petrović, D., Courtade, G., Aachmann, F. L., et al. (2019) Polysaccharide degradation by lytic polysaccharide monoxygenases, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **59**, 54-64, doi: 10.1016/j.sbi.2019.02.015.
5. Baldrian, P., and Valášková, V. (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi, *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 501-521, doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00106.x.
6. Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., and Henrissat, B. (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013, *Nucleic Acids Res.*, **42**, D490-D495, doi: 10.1093/nar/gkt1178.
7. Henrissat, B. A. (1991) Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem. J.*, **280**, 309-316, doi: 10.1042/bj2800309
8. Chhabra, S. R., Shockley, K. R., Ward, D. E., and Kelly, R. M. (2002) Regulation of endo-acting glycosyl hydrolases in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* grown on glucan- and mannan-based polysaccharides, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 545-554, doi: 10.1128/AEM.68.2.545-554.2002.
9. Yuan, S. F., Wu, T. H., Lee, H. L., Hsieh, H. Y., Lin, W. L., et al. (2015) Biochemical characterization and structural analysis of a bifunctional cellulase/xylanase from *Clostridium thermocellum*, *J. Biol. Chem.*, **290**, 5739-5748, doi: 10.1074/jbc.M114.604454.
10. Tan, H., Miao, R., Liu, T., Yang, L., Yang, Y., et al. (2018) A bifunctional cellulase-xylanase of a new *Chryseobacterium* strain isolated from the dung of a straw-fed cattle, *Microb. Biotechnol.*, **11**, 381-398, doi: 10.1111/1751-7915.13034.

11. Flint, H. J., Martin, J., McPherson, C. A., Daniel, A. S., and Zhang, J. X. (1993) A bifunctional enzyme, with separate xylanase and b(1,3-1,4)-glucanase domains, encoded by the xynD gene of *Ruminococcus flavefaciens*, *J. Bacteriol.*, **175**, 2943-2951, doi: 10.1128/jb.175.10.2943-2951.1993.
12. Holck, J., Djajadi, D. T., Brask, J., Pilgaard, B., Krogh, K. B. R. M., et al. (2019) Novel xylanolytic triple domain enzyme targeted at feruloylated arabinoxylan degradation, *Enzyme Microb. Technol.*, **129**, 109353, doi: 10.1016/j.enzmictec.2019.05.010.
13. Kobayashi, T., Sawada, K., Sumitomo, N., Hatada, Y., Hagihara, H., et al. (2003) Bifunctional pectinolytic enzyme with separate pectate lyase and pectin methylesterase domains from an alkaliphilic *Bacillus*, *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 269-277, doi: 10.1023/A:1023698007103.
14. Johansen, J. E., Nielsen, P., and Sjøholm, C. (1999) Description of *Cellulophaga baltica* gen. nov., sp. nov. and *Cellulophaga fucicola* gen. nov., sp. nov. and reclassification of [*Cytophaga*] *lytica* to *Cellulophaga lytica* gen. nov., comb. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 1231-1240, doi: 10.1099/00207713-49-3-1231.
15. Pati, A., Abt, B., Teshima, H., Nolan, M., Lapidus, A., et al. (2011) Complete genome sequence of *Cellulophaga lytica* type strain (LIM-21), *Stand. Genomic Sci.*, **29**, 221-232, doi: 10.4056/sigs.1774329.
16. Elboutachfaiti, R., Delattre, C., Petit, E., and Michaud, P. (2011) Polyglucuronic acids: structures, functions and degrading enzymes, *Carb. Polym.*, **84**, 1-13, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.10.063.
17. Domozych, D. (2019) *Algal Cell Walls*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, doi: 10.1002/9780470015902.a0000315.pub4.
18. Haug, A., Larsen, B., and Smidsrød, O. (1966) A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis, *Acta Chem. Scand.*, **20**, 183-190, doi: 10.1016/B978-0-08-011841-3.50043-4.
19. Isogai, A., and Kato, Y. (1998) Preparation of polyuronic acid from cellulose by TEMPO-mediated oxidation, *Cellulose*, **5**, 153-164, doi: 10.1023/A:1009208603673.
20. Jia, X., Chen, Y., Shi, C., Ye, Y., Wang, P., et al. (2013) Preparation and characterization of cellulose regenerated from phosphoric acid, *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 12405-12414, doi: 10.1021/jf4042358.
21. Ghose, T. K. (1987) Measurement of cellulase activities, *Pure App. Chem.*, **59**, 257-268, doi: 10.1351/pac198759020257.
22. Suberkropp, K. (2005) *Pectin-Degrading Enzymes: Polygalacturonase and Pectin Lyase* in Methods to Study Litter Decomposition (Graça, M. A. C., Bärlocher, F., and Gessner, M. O., eds) Springer, Dordrecht, pp. 267-271, doi: 10.1007/1-4020-3466-0_36.
23. Britton, H. T. K., and Robinson, R. A. (1931) Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal, *J. Chem. Soc.*, 1456-1462, doi: 10.1039/JR9310001456.
24. Lisov, A. V., Belova, O. V., Lisova, Z. A., Vinokurova, N. G., Nage, A. S., et al. (2017) Xylanases of *Cellulomonas flavigena*: expression, biochemical characterization, and biotechnological potential, *AMB Express*, **7**, doi: 10.1186%2Fs13568-016-0308-7.
25. Edgar, R. C. (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1792-1797, doi: 10.1093/nar/gkh340.
26. Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., and Jermin, L. S. (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates, *Nat. Methods*, **14**, 587-589, doi: 10.1038/nmeth.4285.
27. Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., and Minh, B. Q. (2015) IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies, *Mol. Biol. Evol.*, **32**, 268-274, doi: 10.1093/molbev/msu300.
28. Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., and Vinh, L. S. (2018) UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation, *Mol. Biol. Evol.*, **5**, 518-522, doi: 10.1093/molbev/msx281.
29. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., and Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.*, **30**, 2725-2729, doi: 10.1093/molbev/mst197.
30. Kulkarni, S. S., Zhu, Y., Brendel, C. J., and McBride, M. J. (2017) Diverse C-terminal sequences involved in *Flavobacterium johnsoniae* protein secretion, *J. Bacteriol.*, **199**, e00884-16, doi: 10.1128/JB.00884-16.
31. Whelan, S., and Goldman, N. (2001) A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach, *Mol. Biol. Evol.*, **18**, 691-699, doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003851.
32. Gu, X., Fu, Y. X., and Li, W. H. (1995) Maximum likelihood estimation of the heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites, *Mol. Biol. Evol.*, **12**, 546-557, doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040235.
33. Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., et al. (2015) Fungal cellulases, *Chem. Rev.*, **115**, 1308-1448, doi: 10.1021/cr500351c.
34. Zhu, B., and Yin, H. (2015) Alginate lyase: review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications, *Bioengineered*, **6**, 125-131, doi: 10.1080/21655979.2015.1030543.
35. Roesijadi, G., Jones, S. B., Snowden-Swan, L. J., and Zhu, Y. (2010). *Macroalgae as a Biomass Feedstock: A Preliminary Analysis*, Pacific Northwest National Lab. (PNNL), Richland, WA (United States), doi: 10.2172/1006310.
36. Fernand, F., Israel, A., Skjermo, J., Wichard, T., Timmermans, K. R., et al. (2017) Offshore macroalgae biomass for bioenergy production: environmental aspects, technological achievements and challenges, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **75**, 35-45, doi: 10.1016/j.rser.2016.10.046.
37. Jung, K. A., Lim, S. R., Kim, Y., and Park, J. M. (2013) Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery, *Bioresour. Technol.*, **135**, 182-190, doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.025.

38. Plotkin, A. S., Railkin, A. I., Gerasimova, E. I., Pimenov, A. Yu., and Sipenkova, T. M. (2005) Subtidal underwater rock communities of the White Sea: structure and interaction with bottom flow, *Russ. J. Mar. Biol.*, **31**, 335-343, doi: 10.1007/s11179-006-0001-9.
39. Schiener, P., Black, K. D., Stanley, M. S., and Green, D. H. (2015) The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*, *J. Appl. Phycol.*, **27**, 363-373, doi: 10.1007/s10811-014-0327-1.
40. Zheng, F., Tu, T., Wang, X., Wang, Y., Ma, R., et al. (2018) Enhancing the catalytic activity of a novel GH5 cellulase GtCel5 from *Gloeophyllum trabeum* CBS 900.73 by site-directed mutagenesis on loop 6, *Biotechnol. Biofuels*, **11**, doi: 10.1186/s13068-018-1080-5.
41. Wang, W., Archbold, T., Lam, J. S., Kimber, M. S., and Fan, M. Z. (2019) A processive endoglucanase with multi-substrate specificity is characterized from porcine gut microbiota, *Sci. Rep.*, **9**, 13630, doi: 10.1038/s41598-019-50050-1.
42. Wu, B., Zheng, S., Pedroso, M. M., Guddat, L. W., Chang, S., et al. (2018) Processivity and enzymatic mechanism of a multifunctional family 5 endoglucanase from *Bacillus subtilis* BS-5 with potential applications in the saccharification of cellulosic substrates, *Biotechnol. Biofuels*, **11**, doi: 10.1186/s13068-018-1022-2.
43. Karlsson, J., Momcilovic, D., Wittgren, B., Schülein, M., Tjerneld, F., et al. (2002) Enzymatic degradation of carboxymethyl cellulose hydrolyzed by the endoglucanases Cel5A, Cel7B, and Cel45A from *Humicola insolens* and Cel7B, Cel12A and Cel45Acore from *Trichoderma reesei*, *Biopolymers*, **63**, 32-40, doi: 10.1002/bip.1060.
44. Leis, B., Held, C., Bergkemper, F., Dennemarck, K., Steinbauer, R., et al. (2017) Comparative characterization of all cellulosomal cellulases from *Clostridium thermocellum* reveals high diversity in endoglucanase product formation essential for complex activity, *Biotechnol. Biofuels*, **10**, doi: 10.1186/s13068-017-0928-4.
45. Usman, A., Khalid, S., Usman, A., Hussain, Z., and Wang, Y. (2017) *Algal Polysaccharides, Novel Application, and Outlook*, in *Algae Based Polymers, Blends, and Composites Chemistry, Biotechnology and Materials Science* (Zia, K. M., Zuber, M., and Ali, M., eds) Elsevier, pp. 115-153, doi: 10.1016/B978-0-12-812360-7.00005-7.
46. Rasmussen, R. S., and Morrissey, M. T. (2007) Marine biotechnology for production of food ingredients, *Adv. Food Nutr. Res.*, **52**, 237-292, doi: 10.1016/S1043-4526(06)52005-4.
47. Itoh, T., Nakagawa, E., Yoda, M., Nakaichi, A., Hibi, T., et al. (2019) Structural and biochemical characterisation of a novel alginate lyase from *Paenibacillus* sp. str. FPU-7, *Sci. Rep.*, **9**, 14870, doi: 10.1038/s41598-019-51006-1.
48. Wong, T. Y., Preston, L. A., and Schiller, N. L. (2000) Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications, *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**, 289-340, doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.289.
49. Tavernier, M. L., Delattre, C., Petit, E., and Michaud, P. (2008) b-(1,4)-Polyglucuronic acids – an overview, *Open Biotech. J.*, **2**, 73-86, doi: 10.2174/1874070700802010073.
50. Helbert, W., Poulet, L., Drouillard, S., Mathieu, S., Loiodice, M., et al. (2019) Discovery of novel carbohydrate-active enzymes through the rational exploration of the protein sequences space, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 6063-6068, doi: 10.1073/pnas.1815791116.
51. MacDonald, L. C., Weiler, E. B., and Berger, B. W. (2016) Engineering broad-spectrum digestion of polyuronides from an exolytic polysaccharide lyase, *Biotechnol. Biofuels*, **9**, doi: 10.1186/s13068-016-0455-8.
52. Gavriilidou, A., Gutleben, J., Versluis, D., Forgiarini, F., van Passel, M. W. J., et al. (2020) Comparative genomic analysis of *Flavobacteriaceae*: insights into carbohydrate metabolism, gliding motility and secondary metabolite biosynthesis, *BMC Genomics*, **21**, doi: 10.1186/s12864-020-06971-7.
53. Tsung, K., Inouye, S., and Inouye, M. (1989) Factors affecting the efficiency of protein synthesis in *Escherichia coli*. Production of a polypeptide of more than 6000 amino acid residues, *J. Biol. Chem.*, **264**, 4428-4433, doi: 10.1016/S0021-9258(18)83760-7.
54. Frain, K. M., Robinson, C., and van Dijk, J. M. (2019) Transport of folded proteins by the tat system, *Protein J.*, **38**, 377-388, doi: 10.1007/s10930-019-09859-y.
55. Singh, P., Sharma, L., Kulothungan, S. R., Adkar, B. V., Prajapati, R. S., et al. (2013) Effect of signal peptide on stability and folding of *Escherichia coli* thioredoxin, *PLoS One*, **8**, e63442, doi: 10.1371/journal.pone.0063442.
56. Natale, P., Brüser, T., and Driessen, A. J. (2008) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane – distinct translocases and mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 1735-1756, doi: 10.1016/j.bbamem.2007.07.015.
57. Adams, J. M., Gallagher, J. A., and Donnison, I. S. (2009) Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments, *J. Appl. Phycol.*, **21**, 569-574, doi: 10.1007/s10811-008-9384-7.
58. Yoo, G., Park, M. S., and Yang, J.-W. (2015) *Chemical Pretreatment of Algal Biomass*, in *Pretreatment of Biomass. Processes and Technologies* (Pandey, A., Negi, S., Binod, P., and Larroche, C., eds) 1st Edn., Elsevier, pp. 227-258, doi: 10.1016/B978-0-12-800080-9.00012-8.
59. Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., and García-González, M. C. (2015) Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production, *Chem. Eng. J.*, **262**, 939-945, doi: 10.1016/j.cej.2014.10.049.

60. Gimpel, J. A., Ravanal, M. C., Salazar, O., and Lienqueo, M. E. (2018) Saccharification of brown macroalgae using an arsenal of recombinant alginate lyases: potential application in the biorefinery process, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 1671-1682, doi: 10.4014/jmb.1805.05056.
61. Manns, D., Nyffenegger, C., Saake, B., and Meyer, A. S. (2016) Impact of different alginate lyases on combined cellulase–lyase saccharification of brown seaweed, *RSC Adv.*, **6**, 45392-45401, doi: 10.1039/C6RA06669K.
62. Manns, D., Nyffenegger, C., Saake, B., and Meyer, A. S. (2016) Brown seaweed processing: enzymatic saccharification of *Laminaria digitata* requires no pre-treatment, *J. Appl. Phycol.*, **28**, 1287-1294, doi: 10.1007/s10811-015-0663-9.

MULTIFUNCTIONAL ENZYME WITH ENDOGLUCANASE AND ALGINASE/GLUCURONAN LYASE ACTIVITIES FROM BACTERIUM *Cellulophaga lytica*

A. V. Lisov^{1*}, S. S. Kiselev², L. I. Trubitsina¹, O. V. Belova¹,
Z. I. Andreeva-Kovalevskaya¹, I. V. Trubitsin¹, T. V. Shushkova¹, and A. A. Leontievsky¹

¹ Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: ssl208@rambler.ru

² Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

Cellulophaga lytica is a gram negative aerobic bacterium, in the genome of which there are many genes encoding polysaccharide degrading enzymes. One predicted enzyme contains a glycoside hydrolase (GH) domain from the GH5 family and a polysaccharide lyase (PL) domain from the PL31 family. The enzyme also contains the TAT signal peptide and TIGR04183 domain, which indicates the extracellular nature of the enzyme. The enzyme was named CIGP. Phylogenetic analysis showed that the enzymes, which were most closely related to CIGP and contained all four domains (TAT, GH5, PL31, TIGR04183), are widespread among bacterial species belong to the Flavobacteriaceae family. CIGP was expressed in *E. coli*, purified, and its properties were studied. CIGP showed endoglucanase (EC 3.2.1.4) activity and catalyzed the hydrolysis of β -D-glucan, carboxymethylcellulose sodium salt (CMC), amorphous cellulose, but not microcrystalline cellulose and xylan. The products of CMC hydrolysis were cellobiose and cellotriose, while β -D-glucan was hydrolyzed to glucose, cellobiose, cellotetraose, cellopentaose. CIGP was more active against poly β -D-mannuronate blocks than poly α -L-guluronate blocks of alginic acid. This indicates that the enzyme is a polyM lyase (EC 4.2.2.3). CIGP was active against polyglucuronic acid, so it showed glucuronan lyase (EC 4.2.2.14) activity. The enzyme had a neutral pH optimum, was more stable at neutral pH values and had a moderate thermal stability. CIGP effectively saccharified two brown algae, *Saccharina latissima* and *Laminaria digitata*, which indicates the possibility of using the enzyme for saccharification of macroalgae used for biofuel production.

Keywords: GH5 endoglucanase, PL31 alginase, multifunctional enzyme, saccharification of macroalgae