

ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ГЛИКОЗИЛИРОВАННОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ КСИЛАНАЗЫ

Кирибаева А. К.^{1,2*}, Силаев Д. В.¹, Абдуллаева А. Н.¹, Раманкулов Е. М.¹, Хасенов Б. Б.¹

¹Национальный центр биотехнологии,

Кургальжинское шоссе, 13/5, Нур-Султан, 010000, Казахстан

²Евразийский Национальный Университет им. Л. Н. Гумилева, ул.

Сатпаева, 2, г. Нур-Султан, 010000, Казахстан

*kiribayeva@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Основным возобновляемым источником энергии и сырья на Земле является растительная биомасса, большую ее часть составляют полимеры клеточной стенки растений: целлюлоза, гемицеллюлоза и лигнин. Гемицеллюлозы разделяют на три основных типа: ксиланы, маннаны и арабиногалактаны. Ксилан занимает второе место после целлюлозы по распространенности в природе среди углеводов. Специфическими ферментами, расщепляющими ксилан на ксилоолигосахариды и D-ксилозу, являются ксиланазы. Перспективными ксиланазами являются ферменты, полученные из бактерий и мицелиальных грибов. Бактериальные ксиланазы характеризуются высокой удельной активностью, а введение дополнительных манозных цепей могут значительно увеличить стабильность белковой глобулы фермента. Перспективным представляется получение гликозилированного варианта бациллярной ксиланазы, которые известны своей высокой удельной активностью.

Ген ксиланазы *Bacillus sonorensis* T6 был клонирован и экспрессирован в дрожжах *Pichia pastoris*. Рекombинантная ксиланаза была выделена и очищена. Были изучены биохимические характеристики гликозилированной рекombинантной ксиланазы. Установлено, что рекombинантная ксиланаза максимальной активностью при 47–50 °С и рН 6,0. Значения K_m , V_{max} и K_{cat} составляют 3.037 ± 0.362 (мг/мл), 667.8 ± 31 (ед/мг) и 100.3 ± 4.6 (с-1), соответственно. Удельная активность рекombинантного фермента составляет 873,8 ед/мг. Установлено, что гликозилированная рекombинантная ксиланаза обладает высокой температурной стабильностью и сохраняет 47% активности после 2 часовой инкубации при 55 °С. Наряду с температурной стабильностью рекombинантная ксиланаза демонстрирует высокую рН стабильность — 10 часовая инкубация в буферах с рН 3–11 не снижает активность. Изучено влияние ионов металлов, детергентов и органических растворителей на активность рекombинантной гликозилированной ксиланазы.

Высокие биохимические показатели рекombинантной гликозилированной ксиланазы из *Bacillus sonorensis* T6 дают основание о перспективности данного фермента к применению в биотехнологической промышленности, в том числе в пищевой промышленности.

Ключевые слова: ксиланаза, *Pichia pastoris*, ксилан, рекombинантный фермент, гликозилирование.

ВВЕДЕНИЕ

Гемицеллюлоза и целлюлоза являются основными гетерогенными полисахаридами растительной биомассы [1]. Гемицеллюлозы состоят из остатков различных пентоз (D-ксилозы и D-арабинозы) и гексоз (D-маннозы, D-глюкозы и/или D-галактозы) [2]. Гемицеллюлозы, состоящие из остатков β-D-ксилозы, являются ксиланами, являющиеся основным компонентом гемицеллюлозы. β-1,4-ксиланы представляют собой гетерополисахариды с гомополимерной основной цепью из 1,4-связанных звеньев β-D-ксилопиранозы [3]. Двумя основными гемицеллюлазами, ответственными за гидролиз ксилана, являются ксиланаза (КФ 3.2.1.8) и β-ксилозидаза (КФ 3.2.1.37) [2]. Ксиланазы представляют собой эндоферменты, которые гидролизуют гомополимеры с высвобождением ксилоолигомеров, а β-гликозидазы гидролизуют ксилоолигомеры до ксилозы [4]. Ксиланазы интенсивно изучаются, поскольку они используются в пищевой

и кормовой промышленности, при отбеливании целлюлозы и бумаги, в производстве текстиля и биотоплива [5, 6]. Ксиланазы продуцируются многими организмами, например, бактериями, водорослями, грибами, простейшими, брюхоногими и членистоногими [7]. Микробные ксиланазы являются предпочтительными катализаторами гидролиза ксиланов благодаря их высокой специфичности, мягким условиям реакции [8]. Микробные ксиланазы представляют собой белки с молекулярной массой в диапазоне 8–145 кДа [9]. Оптимальная температура для ксиланаз грибного и бактериального происхождения колеблется между 40 °С и 60 °С [8]. Известно большое количество бактериальных и грибных продуцентов природных ксиланаз [5, 10–12]. Ксиланазы также хорошо подходят для клонирования и гомологичной и гетерологичной экспрессии, а штаммами-хозяевами являются *Escherichia coli* [13, 14], *Bacillus subtilis* [15], *Pichia pastoris* [16, 17], *Pichia stipites* [18]. Высокий потенциал ксиланаз для переработки рас-

тительной биомассы стимулирует поиск новых ферментов и разработку новых технологий.

При гидролизе ксилана бактериальные ксиланазы наряду с ксилозой образуют олигоксиланы, являющиеся перспективными пребиотиками и имеющие потенциал к применению в технологиях приготовления продуктов функционального назначения. Ксиланазы используют в пищевой и кормовой промышленности для улучшения реологических свойств хлебобулочных изделий и в качестве ферментной добавки для снижения интипитательных свойств кормов.

Ксиланазы с посттрансляционной модификацией представляют особый интерес. Отмечено, что гликозилированные ксиланазы обладают большей термостабильностью и устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды [19]. В связи с этим представляется перспективным исследование продукции ксиланаз в дрожжах, которые имеют хорошо развитую систему гликозилирования, хорошо секретируют гетерологичные белки и способны к культивированию в условиях глубоинной ферментации в биореакторах большой емкости [20]. Среди дрожжей перспективным представляются метилотрофные дрожжи *P. pastoris* в силу их изученности и простоты культивирования, и которые успешно применяют для получения различных рекомбинантных белков [21].

Целью данной работы была биохимическая характеристика ксиланазы из *Bacillus sonorensis* Т6. Для достижения поставленной цели ксиланазы была получена в рекомбинантной форме в виде гликозилированного белка в дрожжах *P. pastoris*. Рекомбинантный фермент был очищен, с помощью вестерн-блоттинга было подтверждено гликозилирование фермента. Были изучены биохимические характеристики фермента, в том числе определен температурный и рН оптимум, температурная и рН-стабильность, кинетические параметры и изучено влияние ионов металлов, детергентов и растворителей на активность ксиланазы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование и экспрессия гена ксиланазы из *Bacillus sonorensis* Т6 в дрожжевом векторе

Ген ксиланазы из штамма *Bacillus sonorensis* Т6 амплифицировали из вектора рTOP_Blunt_V2/ХунТ6 с использованием ПЦР-праймеров: ХунТ6fw (5'-TTTTCSTTTTGC GCCGCCACACTGTTACGT TAGAACTTC-3'), ХунТ6rv (5'-CCGGAATTCGCTAG CCCAGACTACTGGC-3'), и клонировали в составе вектора рPICZαA по сайтам EcoRI/NotI. Полученный вектор линеализировали эндонуклеазой PmeI в буфере 1XCutSmart (New England Biolabs). Компетентные клетки *P. pastoris* X-33 были трансформированы линеализованным вектором. Положительные клоны были отобраны на агаризованной среде YEPD (1% пептон, 2% дрожжевой экстракт, 2% глюкоза, 2% агар) с антибиотиком зеоцином (200 мкг/мл) и скринированы на наличие гена в геномной ДНК

методом ПЦР с использованием праймеров АОХ1fw (5'-GACTGGTTC AATTGACAAGC-3') и АОХ1rv (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'). Положительные клоны рекомбинантного штамма были инокулированы в питательной среде YEPD для проверки на продуцирующую активность и наработку белка.

Очистка ксиланазы из культуры дрожжей

Наработку дрожжевой культуры проводили в 1000 мл колбе. Культуру нарабатывали в шейкер-инкубаторе в течение 120 часов при 30°C и интенсивном встряхивании (250 об/мин). Для индукции культуры ежедневно добавляли метанол в концентрации 1% от объема. После культивирования культуру центрифугировали при 10000×g (4°C, 30 мин) для удаления дрожжевой массы. Осветленную культуру фильтровали через 0,22 мкм для полного удаления остаточных клеток. Белки осаждали из культуры 60% сульфатом аммония при 4°C в течение 16 ч. Осадок собирали центрифугированием при 40000×g, 4°C в течение 1 часа и суспендировали в 4 мл буфера Макувейна (0,2 М фосфат натрия, 0,1 М лимонной кислоты, рН 6,0). Раствор диализовали на мембране с порогом отсека 10 кДат против буфера Макувейна в объеме 1000 мл на магнитной мешалке в холодильнике в течение 16 часов. Диализованный образец наносили на 80 мл колонку с Sephadex G-100 и промывали колонку буфером Макувейна. После каждого этапа элюции отбирали образцы для определения активности, измерения концентрации белка и для анализа методом ПААГ-ДСН электрофореза.

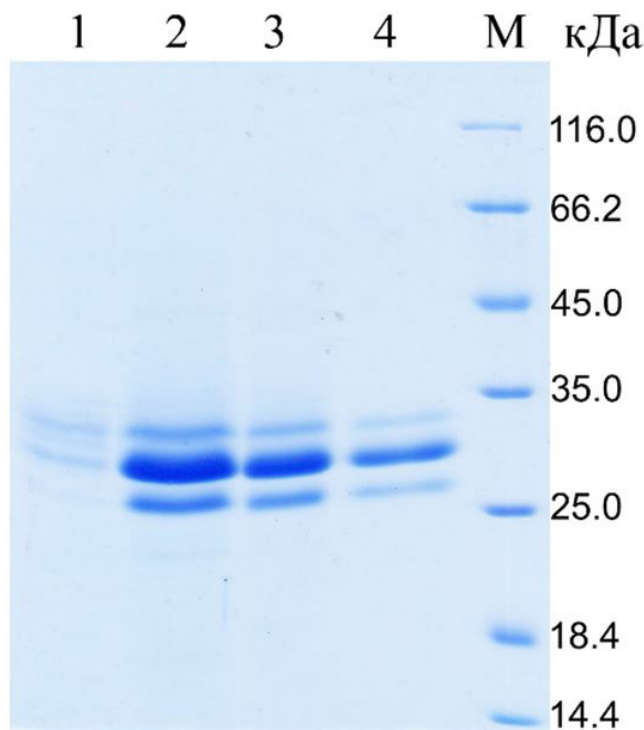
Определение активности ксиланазы

Ксиланазную активность определяли методом восстанавливающих сахаров с использованием 3,5-динитросалициловой кислоты (DNSA) согласно [22] с использованием 1% ксилан березы в 100 мМ фосфатном буфере с рН 6,0 в качестве субстрата. Для этого 1 мл субстрата инкубировали с 40 мкл фермента при 50°C в течение 15 минут. Добавляли 1,5 мл реагента DNSA и кипятили на водяной бане в течение 10 минут. Коэффициент поглощения измеряли при 540 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-1900i (Япония). Калибровочную кривую строили с использованием ксиланозы (Thermo Scientific (Acros Organic), США) в качестве стандарта. Одна единица активности ксиланазы определяли как количество фермента, которое высвобождает 1 мкмоль восстанавливающего сахара-ксиланозы за 1 минуту при стандартных условиях. Измерения были выполнены в трех повторностях, и среднее значение выбирали в качестве результата измерения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При клонировании гена ксиланазы в дрожжевом векторе был получен челночный вектор, в котором ген бактериальной ксиланазы несет с N-конца α-фактор сигнальный пептид из *Saccharomyces cerevisiae* для секреции в дрожжах *P. pastoris*. Путем трансформации компетентных клеток *P. pastoris* штамма X-33 и

отбора зеоцинуустойчивых клонов с подтвержденным методом ПЦР интегрированным геном ксиланазы в хромосомной ДНК рекомбинантного дрожжевого штамма были получены клоны, которые с разной эффективностью продуцировали рекомбинантную ксиланазу при добавлении 1% метанола в качестве единственного источника углерода. При скрининге шести клонов штамма на ксиланазную активность было установлено, что наибольшей активностью обладает клон № 3, активность клона составила 114,5 Ед/мл, после 120 часов культивирования. С использованием данного клона была наработана дрожжевая рекомбинантная культура в объеме 400 мл. Из которой была выделена и очищена рекомбинантная ксиланаза. На рисунке 1 приведены результаты по очистке рекомбинантной ксиланазы. Проведенная очистка с помощью осаждения сульфатом аммония с последующей доочисткой гельфильтрацией на сефарозе оказалась эффективной. Целевой белок эффективно осаждался при 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, после диализа потери составили не более 36%. Специфическая активность очищенной рекомбинантной ксиланазы в стандартных условиях (50°C, pH 6,0) составила 643,3 ед/мг.

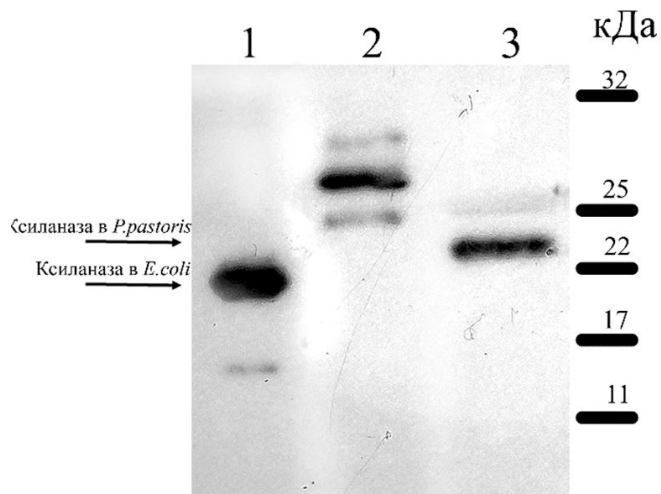


1 — образец дрожжевой культуры, 2- образец после высаливания $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3- образец после диализа, 4 — фракция после очистки на Sephadex G-100

Рисунок 1 — Результаты очистки рекомбинантной ксиланазы

Поскольку в рамках текущего исследования интерес вызывает гликозилирование ксиланазы, то анализ аминокислотной последовательности ксиланазы из *Bacillus sonorensis* Т6 показал, что белок содержит 3 потенциальных сайта для N-гликозилирования: Asp53-Trp54-Ser55, Asp57-Trp58-Ser59, Asp209-Val210-Thr211. Для проверки гликозилирования ксила-

назу обрабатывали дегликазой EndoH (New England Biolabs) и проводили вестерн-блоттинг с использованием поликлональных антител, полученных путем иммунизации кролика рекомбинантной негликозилированной ксиланазой, полученной в клетках *Escherichia coli*. Обработка дегликазой EndoH и идентификация белка антителами подтвердило, что полученный в дрожжах белок сильно гликозилирован, что отражается в вестерн-блоттинге в виде трех полос до и двух полос после обработки дегликазой (Рисунок 2).



1- негликозилированная ксиланаза полученная в *E.coli*,
2- ксиланаза полученная в *P.pastoris*
3- ксиланаза полученная в *P.pastoris* после обработки дегликазой

Рисунок 2 — Результаты вестерн-блоттинга по дегликозилированию рекомбинантной ксиланазы

Исследовано влияние различных значений pH и температуры на ксиланазную активность в диапазоне pH от 2,0 до 10,0 и температур 10–80°C соответственно. На рисунке 3а показаны результаты по относительной активности рекомбинантной ксиланазы в зависимости от pH буферов. Как следует из рисунка 3а pH-оптимум составил 6,0, при значениях pH ниже 4 и выше 10 фермент теряет активность.

Активность ксиланазы в зависимости от температуры показана на рисунке 3б. Температурный оптимум составляет 47°C, а при 55°C фермента сохраняет более 80% активности, при температуре реакции выше 80°C фермент полностью инактивируется.

Температурную стабильность исследовали путем предварительной инкубации фермента при 40°C, 55°C, 60°C и 70°C (рисунок 4) при оптимальном значении pH в течение 120 мин. Предварительная инкубация при 40°C не приводила к снижению активности фермента ниже 80%. Фермент сохранял 47% активности после преинкубации при 55°C в течение 120 мин, после преинкубации при 60°C в течение 30 мин ХупТ6-Р имел только 19,2% активности, а преинкубация при 70°C в течение 30 мин полностью инактивировала фермент.

Исследования по pH стабильности показали, что ксиланаза высокой pH стабильностью в широком диапазоне. При инкубации фермента в буферах с pH 3,0–10,0 в течение более 10 часов при темпера-

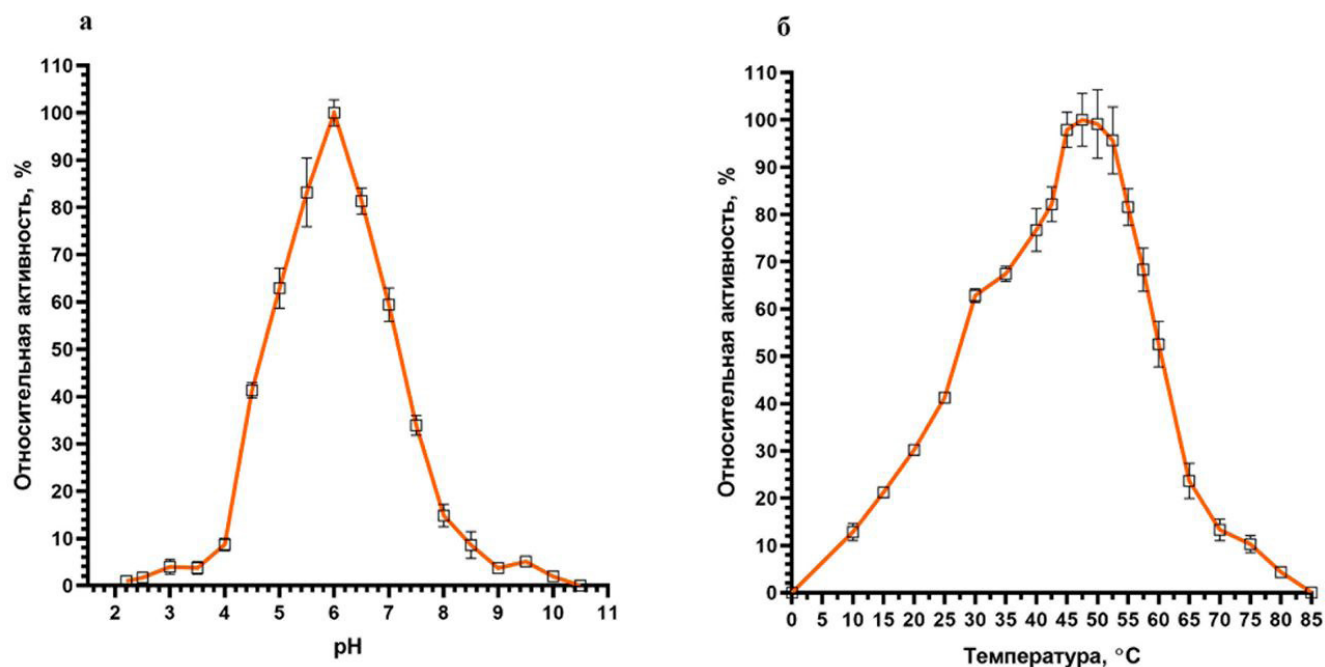


Рисунок 3 — Зависимость активности ксиланазы от значений pH (а) и температуры (б)

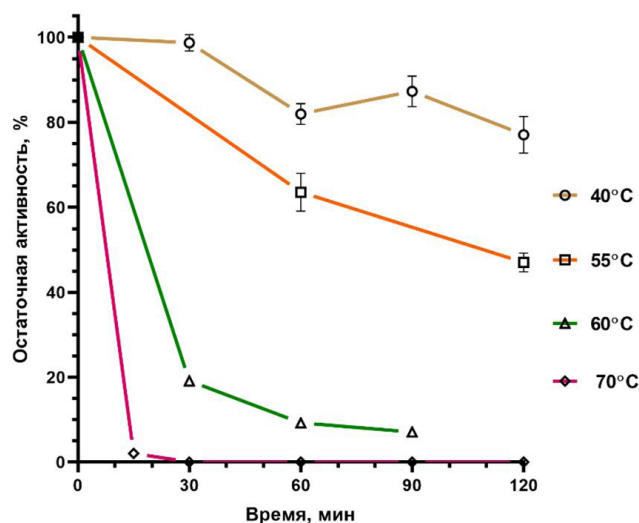


Рисунок 4 — Влияние температур 40°C, 55°C, 60°C, 70°C на активность ксиланазы

туре 22–23°C ксиланаза сохраняет 100% активность, что свидетельствует о высокой толерантности ксиланазы к pH как в кислых, так и в щелочных условиях.

Изучено влияние ионов двухвалентных металлов, детергентов и органических растворителей на активность ксиланазы (таблица). В таблице представлены результаты по изучению влияния ионов металлов Ni²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, и Co²⁺ на активность ксиланазы.

Как следует из представленных данных на ингибирующее действие ксиланазы оказывают ионы Co²⁺, Ni²⁺, Fe³⁺. Активность фермента уменьшается на 7–42%. Ионы Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ повышают активность ксиланазы на 5–22%. Предварительная инкубация ксиланазы с 0,5% неионным детергентом Тритон X-100 повышал ксиланазную активность на 4%. Сильный детергент додецилсульфат натрия в кон-

Таблица. Влияние ионов двухвалентных металлов, детергентов и органических растворителей на активность ксиланазы

Химическое вещество	Концентрация	Остаточная активность, %
Контроль	—	100,0
Ni ²⁺	5 мМ	96,3
Mg ²⁺	5 мМ	114,6
Ca ²⁺	5 мМ	105,7
Zn ²⁺	5 мМ	99,5
Mn ²⁺	5 мМ	122,6
Co ²⁺	5 мМ	92,5
Fe ³⁺	5 мМ	58,1
Triton X-100	0,5 %	104,1
ДСН	10 мМ	24,4
β-меркаптоэтанол	0,5 %	118,9
Дитиотриол (DTT)	10 мМ	107,6
Мочевина	100 мМ	95,7

Гуанидин гидрохлорид	100 мМ	102,6
EDTA	10 мМ	102,2
Ацетон	5%	99,5
Метанол	5%	80,7
Изопропанол	5%	90,0
Бутанол	5%	73,1
Этанол	5%	116,8

центрации 10 мМ сильно подавлял ферментативную активность, более чем на 70%, в тоже время другие детергенты 0,5% β-меркаптоэтанол и 10 мМ ДТТ повышали активность на 4–20%. Ксиланаза проявляет хорошую устойчивость к хаотропным агентам: мочеvine и гидрохлориду гуанидина — преинкубация ксиланазы с мочевиной повышала активность на 4%. Преинкубация с этанолом оказывала стимулирующее действие на 16%, метанол и изопропанол снижали ферментативную активность на 10–20%, а ацетон не влиял на активность ксиланазы.

Значения кинетических параметров рекомбинантной ксиланазы K_m , V_{max} и K_{cat} определяли с использованием различных концентраций ксилана. Значения K_m , V_{max} и K_{cat} составляют 3.037 ± 0.362 (мг/мл), 667.8 ± 31 (ед/мг) и 100.3 ± 4.6 (с-1), соответственно. Удельная активность рекомбинантного фермента в оптимальных условиях (47°С, pH 6,0) составило 873,8 ед/мг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ген ксиланазы казахстанского штамма *Bacillus sonorensis* Т6 был клонирован и экспрессирован в мейлотрофных дрожжах *Pichia pastoris*. Рекомбинантная ксиланаза была выделена и очищена из индуцированной культуры дрожжей. Установлено, что рекомбинантная ксиланаза, полученная в дрожжах гликозилирована и обладает высокой рН стабильностью в диапазоне рН 3–10 и температурной стабильностью при 55°С. Максимальная активность рекомбинантной гликозилированной ксиланазы отмечена при рН 6,0 и температуре 47°С. Изучены кинетические параметры рекомбинантной гликозилированной ксиланазы и исследовано влияние ионов двухвалентных металлов, детергентов и органических растворителей на активность фермента. Высокая устойчивость к кислому и щелочному значению рН, хорошая температурная стабильность гликозилированной ксиланазы свидетельствуют о перспективности данного фермента для применений в различных отраслях биотехнологической промышленности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Проведенные исследования были финансированы Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан (BR10764998).

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Sixtra H. Handbook of Pulp // Wiley-VCH. — 2006. — P. 1348
- 2 Wickramasinghe G., Rathnayake P., Chandrasekharan N. V., Weerasinghe M. S. S., Wijesundera R. L. C., Wijesundera W. S. S. Expression, Docking, and Molecular Dynamics of Endo-beta-1,4-xylanase I Gene of *Trichoderma virens* in *Pichia stipitis* // BioMed research international. — 2017. — Vol. 2017. — P. 4658584. PMID: 28856159. DOI: 10.1155/2017/4658584
- 3 Chakdar H., Kumar M., Pandiyan K., Singh A., Nanjappan K., Kashyap P. L., Srivastava A. K. Bacterial xylanases: biology to biotechnology // 3 Biotech. — 2016. — Vol. 6, N 2. — P. 150. PMID: 28330222. DOI: 10.1007/s13205-016-0457-z.
- 4 Juturu V., Wu J. C. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications // Biotechnol. Adv. — 2012. — Vol. 30, N 6. — P. 1219–1227. PMID: 22138412.
- 5 Sridevi A., Ramanjaneyulu G., Suvarnalatha Devi P. Biobleaching of paper pulp with xylanase produced by *Trichoderma asperellum* // 3 Biotech. — 2017. — Vol. 7, N 4. — P. 266. PMID: 28794921. DOI: 10.1007/s13205-017-0898-z.
- 6 Ghoshal G., Shivhare U. S., Banerjee U. C. Rheological properties and microstructure of xylanase containing whole wheat bread dough // J Food Sci Technol. — 2017. — Vol. 54, N 7. — P. 1928–1937. PMID: 28720949. DOI: 10.1007/s13197-017-2627-3.
- 7 Liu W., Brennan M. A., Serventi L., Brennan C. S. Effect of cellulase, xylanase and alpha-amylase combinations on the rheological properties of Chinese steamed bread dough enriched in wheat bran // Food Chem. — 2017. — Vol. 234. — P. 93–102.
- 8 Jagtap S., Deshmukh R. A., Menon S., Das S. Xylooligosaccharides production by crude microbial enzymes from agricultural waste without prior treatment and their potential application as nutraceuticals // Biore-sour Technol. — 2017. — Vol. 245. — P. 283–288. PMID: 28892703. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.08.174.
- 9 Nieto-Dominguez M., de Eugenio L. I., York-Duran M. J., Rodriguez-Colinas B., Plou F. J., Chenoll E., Pardo E., Codoner F., Jesus Martinez M. Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal GH11 xylanase // Food Chem. — 2017. — Vol. 232. — P. 105–113. PMID: 28490053. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.03.149.
- 10 Aftab M. N., Zafar A., Iqbal I., Kaleem A., Zia K. M., Awan A. R. Optimization of saccharification potential of recombinant xylanase from *Bacillus licheniformis* // Bioengineered. — 2017. — Vol. 9, N 1. — P. 159–

165.PMID: 28886289.

11 Parab P., Khandeparker R., Amberkar U., Khodse V. Enzymatic saccharification of seaweeds into fermentable sugars by xylanase from marine *Bacillus* sp. strain BT21 // 3 Biotech. – 2017. – Vol. 7, N 5. – P. 296. PMID: 28868223. DOI: 10.1007/s13205-017-0921-4.

12 Khandeparker R., Parab P., Amberkar U. Recombinant Xylanase from *Bacillus tequilensis* BT21: Biochemical Characterisation and Its Application in the Production of Xylobiose from Agricultural Residues // Food Technol Biotechnol. – 2017. – Vol. 55, N 2. – P. 164–172. PMID: 28867946. DOI: 10.17113/ftb.55.02.17.4896.

13 Mallek-Fakhfakh H., Fakhfakh J., Walha K., Hassairi H., Gargouri A., Belghith H. Enzymatic hydrolysis of pretreated Alfa fibers (*Stipa tenacissima*) using beta-d-glucosidase and xylanase of *Talaromyces thermophilus* from solid-state fermentation // Int J Biol Macromol. – 2017. – Vol. 103. – P. 543–553. PMID: 28527996. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.078

14 Gallardo C., Dadalt J. C., Kiarie E., Trindade Neto M. A. Effects of multi-carbohydrase and phytase on standardized ileal digestibility of amino acids and apparent metabolizable energy in canola meal fed to broiler chicks // Poult Sci. – 2017. – Vol. 96, N 9. – P. 3305–3313. PMID: 28854754. DOI: 10.3382/ps/pex141.

15 Korkmaz M. N., Ozdemir S. C., Uzel A. Xylanase production from marine derived *Trichoderma pleuroticola* 08CK001 strain isolated from Mediterranean coastal sediments // J Basic Microbiol. – 2017. — Vol. 57, N 10. — P. 839–851. PMID: 28758291. DOI: 10.1002/jobm.201700135

16 Daas M. J. A., Martinez P. M., van de Weijer A. H. P., van der Oost J., de Vos W. M., Kabel M. A., van Kranenburg R. Biochemical characterization of the xylan hydrolysis profile of the extracellular endo-xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* T12 // BMC Biotechnol. – 2017. – Vol. 17, N 1. – P. 44. PMID: 28521816. DOI: 10.1186/s12896-017-0357-2.

17 Ali S. S., Wu J., Xie R., Zhou F., Sun J., Huang M. Screening and characterizing of xylanolytic and xylose-fermenting yeasts isolated from the wood-feeding termite, *Reticulitermes chinensis* // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, N 7. – E. 0181141. PMID: 28704553. DOI: 10.1371/journal.pone.0181141.

18 Wang H, Yang L, Ping Y, Bai Y, Luo H, Huang H, Yao B. Engineering of a *Bacillus amyloliquefaciens* Strain with High Neutral Protease Producing Capacity and Optimization of Its Fermentation Conditions // PLoSOne. — 2016. — Vol. 11, N 1. — P. 146373. PMID: 26752595. DOI: 10.1371/journal.pone.0146373

19 Orita T., Sakka M., Kimura T., Sakka K. Characterization of *Ruminiclostridium josui* arabinoxylan arabinofuranohydrolase, RjAxB43B, and RjAxB43B-containing xylanolytic complex // Enzyme Microb Technol. – 2017. – Vol. 104. – P. 37–43. PMID: 28648178. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2017.05.008.

20 Sahay H., Yadav A. N., Singh A. K., Singh S., Kausshik R., Saxena A. K. Hot springs of Indian Himalayas:

potential sources of microbial diversity and thermostable hydrolytic enzymes // 3 Biotech. – 2017. – Vol. 7, N 2. – P. 118. PMID: 28567630. DOI: 10.1007/s13205-017-0762-1.

21 Sari E, Loğoğlu E, Öktemer A. Purification and characterization of organic solvent stable serine alkaline protease from newly isolated *Bacillus circulans* M34 // Biomedical Chromatography. — 2015. — Vol. 29, N 9. — P. 1356–1363. PMID: 25677873. DOI: 10.1002/bmc.3431

22 Miller G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar // Analytical Chemistry. – 1959. – Vol. 31. – P. 426–428.

REFERENCES

1 Sixtra, H. Handbook of Pulp // Wiley-VCH. – 2006. – P. 1348

2 Wickramasinghe, G., Rathnayake, P., Chandrasekharan, N. V., Weerasinghe, M. S. S., Wijesundera, R. L. C., Wijesundera, W. S. S. Expression, Docking, and Molecular Dynamics of Endo-beta-1,4-xylanase I Gene of *Trichoderma virens* in *Pichia stipitis* // BioMed research international. – 2017. – Vol. 2017. – P. 4658584. PMID: 28856159. DOI: 10.1155/2017/4658584

3 Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P. L., Srivastava, A. K. Bacterial xylanases: biology to biotechnology // 3 Biotech. – 2016. – Vol. 6, N 2. – P. 150. PMID: 28330222. DOI: 10.1007/s13205-016-0457-z.

4 Juturu, V., Wu, J. C. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications // Biotechnol. Adv. – 2012. – Vol. 30, N 6. – P. 1219–1227. PMID: 22138412.

5 Sridevi, A., Ramanjaneyulu, G., Suvarnalatha, Devi P. Biobleaching of paper pulp with xylanase produced by *Trichoderma asperellum* // 3 Biotech. – 2017. – Vol. 7, N 4. – P. 266. PMID: 28794921. DOI: 10.1007/s13205-017-0898-z.

6 Ghoshal, G., Shivhare, U. S., Banerjee, U. C. Rheological properties and microstructure of xylanase containing whole wheat bread dough // J Food Sci Technol. – 2017. – Vol. 54, N 7. – P. 1928–1937. PMID: 28720949. DOI: 10.1007/s13197-017-2627-3.

7 Liu, W., Brennan, M. A., Serventi, L., Brennan, C. S. Effect of cellulase, xylanase and alpha-amylase combinations on the rheological properties of Chinese steamed bread dough enriched in wheat bran // Food Chem. – 2017. – Vol. 234. – P. 93–102.

8 Jagtap, S., Deshmukh, R. A., Menon, S., Das, S. Xylooligosaccharides production by crude microbial enzymes from agricultural waste without prior treatment and their potential application as nutraceuticals // Bioresour Technol. – 2017. – Vol. 245. – P. 283–288. PMID: 28892703. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.08.174.

9 Nieto-Dominguez, M., de Eugenio, L. I., York-Duran, M. J., Rodriguez-Colinas, B., Plou, F. J., Chenoll, E., Pardo, E., Codoner, F., Jesus Martinez, M. Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood

- xylan by a novel fungal GH11 xylanase // *Food Chem.* – 2017. – Vol. 232. – P. 105-113. PMID: 28490053. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.03.149.
- 10 Aftab, M. N., Zafar, A., Iqbal, I., Kaleem, A., Zia, K. M., Awan, A. R. Optimization of saccharification potential of recombinant xylanase from *Bacillus licheniformis* // *Bioengineered.* – 2017. – Vol. 9, N 1. – P. 159-165. PMID: 28886289.
- 11 Parab, P., Khandeparker, R., Amberkar, U., Khodse, V. Enzymatic saccharification of seaweeds into fermentable sugars by xylanase from marine *Bacillus* sp. strain BT21 // *3 Biotech.* – 2017. – Vol. 7, N 5. – P. 296. PMID: 28868223. DOI: 10.1007/s13205-017-0921-4.
- 12 Khandeparker, R., Parab, P., Amberkar, U. Recombinant Xylanase from *Bacillus tequilensis* BT21: Biochemical Characterisation and Its Application in the Production of Xylobiose from Agricultural Residues // *Food Technol Biotechnol.* – 2017. – Vol. 55, N 2. – P. 164-172. PMID: 28867946. DOI: 10.17113/ftb.55.02.17.4896.
- 13 Mallek-Fakhfakh, H., Fakhfakh, J., Walha, K., Hassairi, H., Gargouri, A., Belghith H. Enzymatic hydrolysis of pretreated Alfa fibers (*Stipa tenacissima*) using beta-d-glucosidase and xylanase of *Talaromyces thermophilus* from solid-state fermentation // *Int J Biol Macromol.* – 2017. – Vol. 103. – P. 543-553. PMID: 28527996. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.078
- 14 Gallardo, C., Dadalt, J. C., Kiarie, E., Trindade Neto, M. A. Effects of multi-carbohydrase and phytase on standardized ileal digestibility of amino acids and apparent metabolizable energy in canola meal fed to broiler chicks // *Poult Sci.* – 2017. – Vol. 96, N 9. – P. 3305-3313. PMID: 28854754. DOI: 10.3382/ps/pex141.
- 15 Korkmaz, M. N., Ozdemir, S. C., Uzel, A. Xylanase production from marine derived *Trichoderma pleuroticola* 08CK001 strain isolated from Mediterranean coastal sediments // *J Basic Microbiol.* – 2017. – Vol. 57, N 10. – P. 839-851. PMID: 28758291. DOI: 10.1002/jobm.201700135
- 16 Daas, M. J. A., Martinez, P. M., van de Weijer A. H. P., van der Oost J., de Vos W. M., Kabel M. A., van Kranenburg R. Biochemical characterization of the xylan hydrolysis profile of the extracellular endo-xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* T12 // *BMC Biotechnol.* – 2017. – Vol. 17, N 1. – P. 44. PMID: 28521816. DOI: 10.1186/s12896-017-0357-2.
- 17 Ali, S. S., Wu, J., Xie, R., Zhou, F., Sun, J., Huang, M. Screening and characterizing of xylanolytic and xylose-fermenting yeasts isolated from the wood-feeding termite, *Reticulitermes chinensis* // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, N 7. – E. 0181141. PMID: 28704553. DOI: 10.1371/journal.pone.0181141.
- 18 Wang, H, Yang, L, Ping, Y, Bai, Y, Luo, H, Huang, H, Yao, B. Engineering of a *Bacillus amyloliquefaciens* Strain with High Neutral Protease Producing Capacity and Optimization of Its Fermentation Conditions // *PLoSOne.* – 2016. – Vol. 11, N 1. – P. 146373. PMID: 26752595. DOI: 10.1371/journal.pone.0146373
- 19 Orita, T., Sakka, M., Kimura, T., Sakka, K. Characterization of *Ruminiclostridium josui* arabinoxylan arabinofuranohydrolase, RjAxx43B, and RjAxx43B-containing xylanolytic complex // *Enzyme Microb Technol.* – 2017. – Vol. 104. – P. 37-43. PMID: 28648178. DOI: 10.1016/j.enzymictec.2017.05.008.
- 20 Sahay, H., Yadav, A. N., Singh, A. K., Singh, S., Kaushik, R., Saxena, A. K. Hot springs of Indian Himalayas: potential sources of microbial diversity and thermostable hydrolytic enzymes // *3 Biotech.* – 2017. – Vol. 7, N 2. – P. 118. PMID: 28567630. DOI: 10.1007/s13205-017-0762-1.
- 21 Sari, E, Loğoğlu, E, Öktemer, A. Purification and characterization of organic solvent stable serine alkaline protease from newly isolated *Bacillus circulans* M34 // *Biomedical Chromatography.* – 2015. – Vol. 29, N 9. – P. 1356-1363. PMID: 25677873. DOI: 10.1002/bmc.3431
- 22 Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar // *Analytical Chemistry.* – 1959. – Vol. 31. – P. 426-428.

ГЛИКОЗИЛДЕНГЕН РЕКОМБИНАНТТЫ КСИЛАЗАНЫҢ БИОХИМИЯЛЫҚ СИПАТТАМАЛАРЫН ЗЕРТТЕУ

Кирибаева А. К.^{1,2*}, Силаев Д. В.¹, Абдуллаева А. Н.¹, Раманқұлов Е. М.¹, Хасенов Б. Б.¹

¹ Ұлттық биотехнология орталығы

Қорғалжын тас жолы, 13/5, Нұр-сұлтан қ., 010000, Қазақстан

²Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті

Сәтпаев көшесі 2, Нұр-сұлтан қ., 010000, Қазақстан

*kiribaeva@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Жер бетіндегі негізгі жаңартылатын энергия мен шикізат көзі өсімдік биомассасы, оның көп бөлігін өсімдіктердің жасуша қабырғасының полимерлері құрайды: целлюлоза, гемицеллюлоза және лигнин. Гемицеллюлозаларды үш негізгі топқа бөледі: ксилан, маннан және арабиногалактандар. Ксилан целлюлозадан кейін көмірсулар арасында табиғатта таралуы бойынша екінші орында. Ксиланды ксилоолигосахаридтер мен D-ксилозаға ыдырататын арнайы ферменттер — ксиланазалар. Бактериялар мен мицелий саңырауқұлақтарынан алынған ксиланазалар болашағы мол ферменттер болып табылады. Бактериялы ксиланазалардың меншікті белсенділігі жоғары, ал қосымша маннозалы тізбектерді енгізу ферменттің ақуыз глобуласының тұрақтылығын едәуір ұлғайта алады. Меншікті белсенділігінің жоғарылығымен танымал бациллалы ксиланазаның гликозилденген нұсқасын алу перспективалы болып көрінеді.

Bacillus sonorensis T6 ксиланаза гені *Pichia pastoris* ашытқыларында клондалып, экспрессияланды. Рекомбинантты ксиланаза бөлініп алынып, тазаланды. Гликозилденген рекомбинантты ксиланазаның биохимиялық сипаттамалары зерттелінді. Рекомбинантты ксиланазаның максималды белсенділігі 47–50°C және рН 6,0 кезінде екені анықталды. K_m , V_{max} және K_{cat} мағыналары 3.037 ± 0.362 (мг/мл), 667.8 ± 31 (бірл./мг) және 100.3 ± 4.6 (с-1), сәйкесінше. Рекомбинантты ферменттің меншікті белсенділігі 873,8 бірл./мг-ды құрайды. Гликозилденген рекомбинантты ксиланазаның жоғары температуралық тұрақтылығы бар екені және 55°C-та 2 сағаттық инкубациядан кейін белсенділігінің 47% -ын сақтайтыны белгілі болды. Температуралық тұрақтылықпен қатар рекомбинантты ксиланаза жоғары рН тұрақтылық та көрсетеді — рН 3–11 буферлерінде 10 сағаттық инкубация белсенділікті төмендетпейді. Металл иондары, детергенттер және органикалық еріткіштердің рекомбинантты гликозилденген ксиланазаның белсенділігіне әсері зерттелінді.

Bacillus sonorensis T6-дан алынған рекомбинантты гликозилденген ксиланазаның жоғары биохимиялық көрсеткіштері бұл ферменттің биотехнология және тамақ өндірісінде қолдануының перспективтілігі туралы негіз береді.

Негізгі сөздер: ксиланаза, *Pichia pastoris*, ксилан, рекомбинантты фермент, гликозилдеу.

STUDY OF THE BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF GLYCOSYLATED RECOMBINANT XYLANASE

Kiribayeva A. K.^{1,2*}, Silayev D. V.¹, Abdullayeva A. N.¹, Ramankulov Ye.M.¹, Khassenov B. B.¹

¹National center for biotechnology

13/5, Kurgalzhynskoye road, Nur-Sultan, 010000, Kazakhstan

²L.N.Gumilyov Eurasian National University

2, Satpayev str., Nur-Sultan, 010000, Kazakhstan

*kiribayeva@biocenter.kz

ABSTRACT

The main renewable source of energy and raw materials on Earth is plant biomass, most of which consists of plant cell wall polymers: cellulose, hemicellulose, and lignin. Hemicelluloses are divided into three main types: xylans, mannans and arabinogalactans. Xylan is the second most abundant carbohydrate in nature after cellulose. The specific enzymes that hydrolyze xylan into xylooligosaccharides and D-xylose are xylanases. Prospective xylanases are enzymes derived from bacteria and mycelial fungi. Bacterial xylanases are characterized by high unitary activity, and additional manose chains can significantly increase the stability of the enzyme protein globule. Obtaining a glycosylated variant of bacillary xylanase, which are known for their high specific activity, seems promising.

The *Bacillus sonorensis* T6 xylanase gene was cloned and expressed in the yeast *Pichia pastoris*. The recombinant xylanase was isolated and purified. The biochemical characteristics of the glycosylated recombinant xylanase were studied. It was found that the recombinant xylanase had maximum activity at 47–50°C and pH 6.0. The K_m , V_{max} and K_{cat} values are 3.037 ± 0.362 (mg/ml), 667.8 ± 31 (units/mg) and 100.3 ± 4.6 (s⁻¹), respectively. The unitary activity of the recombinant enzyme is 873.8 units/mg. The glycosylated recombinant xylanase was found to have high temperature stability and retained 47% activity after a 2-hour incubation at 55°C. In addition to temperature stability, recombinant xylanase showed high pH stability — 10 h incubation in buffers with pH 3–11 did not decrease the activity. The effect of metal ions, detergents, and organic solvents on the activity of recombinant glycosylated xylanase was studied.

The high biochemical parameters of recombinant glycosylated xylanase from *Bacillus sonorensis* T6 suggest that this enzyme is promising for use in the biotechnology and food industry.

Keywords: xylanase, *Pichia pastoris*, xylan, recombinant enzyme, glycosylation.