

УДК 577.152

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КСИЛАНАЗ XylA И XylE ИЗ ГРИБА *Penicillium canescens*

Ю.А. Денисенко, Д.А. Мерзлов, А.В. Гусаков, А.В. Чекушина,
А.П. Синицын

(Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; e-mail: avgusakov@enzyme.chem.
msu.ru)*

Из ферментного препарата, полученного на основе грибного продуцента *Penicillium canescens*, выделены две ксиланазы (XylA и XylE), принадлежащие к 10-й семье гликозидгидролаз. Изучена кинетика гидролиза глюконооксиана и арабинооксиана под действием очищенных ферментов, а также влияние белковых (ХИР-подобных) ингибиторов, содержащихся в экстракте ржи, на вискозиметрическую активность ксиланаз. Ксиланаз XylA обеспечивает более глубокую степень конверсии глюконооксиана по сравнению с XylE, тогда как XylE более эффективна при гидролизе арабинооксиана. В отличие от XylA XylE оказалась устойчивой к действию белковых ингибиторов ржи – свойство, редко встречающееся среди грибных ферментов 10-й семьи. Таким образом, XylE является весьма перспективным ферментом для использования в качестве добавки к комбикормам на основе злаков. Ксиланаз XylA потенциально может применяться для биоотбеливания целлюлозы, получаемой из лиственной древесины, одним из компонентов которой является глюконооксиан.

Ключевые слова: ксиланаз, *Penicillium canescens*, белковые ингибиторы, ксилан, кинетика гидролиза.

Ксиланы (гемицеллюлозы) являются одними из основных структурных компонентов клеточной стенки растений и составляют примерно треть возобновляемой растительной биомассы на Земле [1]. Это гетерополимеры, которые состоят из линейной цепочки соединенных β -1,4-гликозидными связями остатков D-ксилозы, частично ацетилированных и имеющих в боковых цепях заместители в виде остатков D-глюкуроновой кислоты, α -L-арабинозы, феруловой и *n*-кумаровой кислот [2, 3]. Следует отметить, что структура ксиланов существенно зависит от вида растений. Арабиноксианы входят в состав клеточной стенки мягкой (хвойной) древесины и злаков, тогда как глюконооксианы являются составной частью твердых (лиственных) пород деревьев [4].

Главными компонентами комплекса ферментов, осуществляющих деструкцию ксиланов в природе, являются эндо-1,4- β -ксилазы, или просто ксиланазы (КФ 3.2.1.8), катализирующие неупорядоченный гидролиз гликозидных связей между остатками D-ксилозы в основной цепи полимера. Основными источниками ксиланаз являются микроорганизмы – бактерии, археи, микроскопические грибы и дрожжи [1–5]. Ксиланазы нашли широкое применение в процессах биоконверсии

лигноцеллюлозных отходов, при биоотбеливании целлюлозы в целлюлозно-бумажной промышленности, как компоненты комбикормов для сельскохозяйственных животных и птиц, а также в хлебопечении [1, 2, 6]. Стоит, однако, отметить, что не все применяемые на практике ферментные препараты ксиланаз обладают необходимыми свойствами: достаточной термостабильностью, высокой удельной активностью, а также устойчивостью по отношению к белковым ингибиторам злаков, открытым в конце прошлого века. Последние оказывают негативное действие на ксиланазы при гидролизе ксиланов, содержащихся в зерне злаков, в частности при использовании этих ферментов в качестве компонентов комбикормов [7]. Поэтому поиск новых ксиланолитических ферментов и исследование их свойств остаются весьма актуальными задачами.

Ранее из микроскопического гриба *Penicillium canescens* (продуцента гемицеллюлаз) были выделены ксиланазы XylA и XylE, принадлежащие к 10-й семье гликозидгидролаз, были частично изучены их свойства, а также секвенированы кодирующие их гены [8–11]. Однако не были исследованы такие важные с точки зрения практического применения ферментов свойства, как устойчивость

* Кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ.

по отношению к белковым ингибиторам злаков, а также не изучалась детально кинетика гидролиза различных видов ксиланов. В данной работе проведено сравнение свойств ксиланаз XylA и XylE, выделенных из *P. canescens*, с точки зрения перспектив их возможного применения на практике.

Материалы и методы

Выделение и очистка ферментов

Выделение и очистку ксиланаз *P. canescens* осуществляли в три этапа: обессоливание ферментного препарата, анионообменная хроматография и гидрофобная хроматография белков. Все стадии фракционирования и очистки осуществляли с использованием хроматографической системы АКТА UPC («GE Healthcare», США), которая состояла из автоматического контроллера, насосов, проточного ультрафиолетового детектора, кондуктометра и коллектора фракций. Предварительно растворенный в 0,05 М Na-ацетатном буфере (pH 5,0) ферментный препарат (культуральная жидкость гриба, полученная в лабораторном ферментере и подвергнутая лиофильной сушке) обессоливали на колонке с носителем Bio-Gel P2 («Bio-Rad Laboratories», США), уравновешенной 0,02 М буфером Bis-Tris/HCl (pH 6,8). Для осуществления анионообменной хроматографии использовали колонку объемом 8 мл, заполненную носителем Source 15Q («GE Healthcare», США). Пробу обессоленного препарата наносили на колонку, уравновешенную 0,02 М буфером Bis-Tris/HCl (pH 6,8). Элюирование связавшегося с носителем белка проводили в градиенте концентрации NaCl от 0 до 0,4 М. Полученные фракции, обладающие активностью по ксилану, подвергали гидрофобной хроматографии на колонке с носителем Source 15 ISO («GE Healthcare», США), уравновешенной 0,05 М Na-ацетатным буфером (pH 5,0) в присутствии 1,7 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Связавшийся с носителем белок элюировали 0,05 М Na-ацетатным буфером (pH 5,0) в линейно убывающем (от 1,7 до 0 М) градиенте $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Полученные фракции, содержащие гомогенные XylA и XylE, обессоливали на колонке с носителем Bio-Gel P2, уравновешенной 0,05 М Na-ацетатным буфером (pH 5,0).

Электрофорез белковых фракций проводили в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии ДДС-Na на приборе «Mini Protean II» («Bio-Rad Laboratories», США). Окраску белков проводили с помощью красителя Coomassie Blue R-250 («Ferak», Германия).

Для идентификации выделенных ферментов использовали времяпролетную МАЛДИ-масс-

спектрометрию. Кусочки геля после электрофореза, вырезанные из соответствующих белковых полос, отмывали от красителя и обрабатывали трипсином («Promega», США), используя стандартный протокол [12]. Полученные пептиды экстрагировали с помощью 20%-го раствора ацетонитрила в воде, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты, и подвергали МАЛДИ-масс-спектрометрическому анализу на масс-спектрометре «UltrafleXtreme» («Bruker Daltonik GmbH», Германия). Анализ полученных данных осуществляли с помощью программы Mascot (<http://www.matrixscience.com/>).

Исследование активности и кинетики действия ферментов

Активность ферментов по отношению к глюкоуроноксилану из березы («Sigma», США) и арабиноксилану из пшеницы («Megazyme», Австралия) определяли методом Шомоди–Нельсона при 50°C и pH 5,0, как описано в работе [13]. Зависимость активности ксиланаз от pH и температуры, а также кинетические параметры действия ферментов также определяли по методикам, описанным в работе [13].

Кинетику гидролиза глюкоуроноксилана и арабиноксилана изучали в термостатируемых при 40°C пробирках объемом 2 мл. К 1 мл запасного раствора субстрата (10 мг/мл) в 0,1 М Na-ацетатном буфере (pH 5,5) добавляли 0,8 мл того же буфера, смесь прогревали при 40°C в течение 5 мин и вносили 0,2 мл фермента для начала ферментативной реакции. Количество вносимого фермента рассчитывали таким образом, чтобы его активность в реакционной смеси составляла 0,075 Ед/мл. В ходе реакции отбирали пробы объемом 0,1 мл и анализировали в них восстанавливающие сахара методом Шомоди–Нельсона [13].

Исследование влияния белковых ингибиторов ржи на активность ксиланаз

Рожь (урожай 2014 г., Витебская обл. Республики Беларусь) предварительно измельчали до размера частиц ~0,5 мм на мельнице «MF 10.1» («IKA», Германия). Для приготовления экстракта использовали 0,1 М Na-ацетатный буфер (pH 5,0) из расчета 100 мл на 20 г измельченной ржи. Экстракцию проводили в течение 1 ч при 40°C, 140 об/мин в шейкере «Innova 40» («New Brunswick Scientific», США). Полученный экстракт центрифугировали в течение 5 мин при 5000 об/мин на центрифуге «Universal 320R» («Hettich», Швейцария). Супернатант фильтровали через полиэфирную ткань. Таким образом был приготовлен нативный экстракт ржи, хранение ко-

того осуществляли во льду. Половину нативного экстракта выдерживали в кипящей водяной бане в течение 5 мин. После термической обработки экстракт центрифугировали в течение 5 мин при 5000 об/мин, получая таким образом супернатант – термообработанный экстракт ржи с инактивированными белковыми ингибиторами ксиланаз, который также хранили во льду.

Исследование влияния ферментов на вязкость экстракта ржи осуществляли с помощью метода капиллярной вискозиметрии, используя модифицированную методику [14]. К 4 мл экстракта в вискозиметре Оствальда прибавляли 1 мл Na-ацетатного буфера (0,1 М; pH 5,0), раствор перемешивали, продувая воздух с помощью резиновой груши, и инкубировали при 40°C в течение 5 мин. После этого добавляли аликвоту раствора фермента (50 мкл) в 0,1 М Na-ацетатном буфере (pH 5,0), содержащую 1 Ед ксиланазной активности, и через определенные промежутки времени измеряли время истечения экстракта из вискозиметра (при 40°C). Время реакции отсчитывали от момента добавления к экстракту раствора фермента. Результаты представляли в виде уменьшения приведенной вязкости разбавленного экстракта после 20 мин ферментативной реакции. Приведенная вязкость определяется выражением

$$\eta_{пр} = (\eta_{экстракт} - \eta_{буфер}) / (\eta_{буфер} \times C),$$

где $\eta_{экстракт}$, $\eta_{буфер}$ – вязкость экстракта и буфера, определенная с помощью метода капиллярной вискозиметрии, C – концентрация полимера (г/л).

Время ферментативной реакции рассчитывали как сумму времени, прошедшего до начала измерения времени истечения раствора, и половины измеренного времени истечения.

Результаты и их обсуждение

Выделенные ксиланазы *P. canescens* были гомогенными по данным электрофореза в присутствии ДДС-Na (рис. 1), согласно которым молекулярные массы XylA и XylE составили около 30 и 40 кДа, что хорошо согласуется с литературными данными [9, 11]. Оба фермента были идентифицированы методом МАЛДИ-масс-спектрометрического картирования пептидов. В масс-спектрах трипсиновых гидролизатов XylA и XylE были обнаружены пики (17 и 21), соответствующие по массе теоретическим триптическим пептидам из данных ферментов, при этом степень покрытия аминокислотной последовательности составила 76 и 55% соответственно.

В таблице представлены данные по удельной активности выделенных ксиланаз и их основным

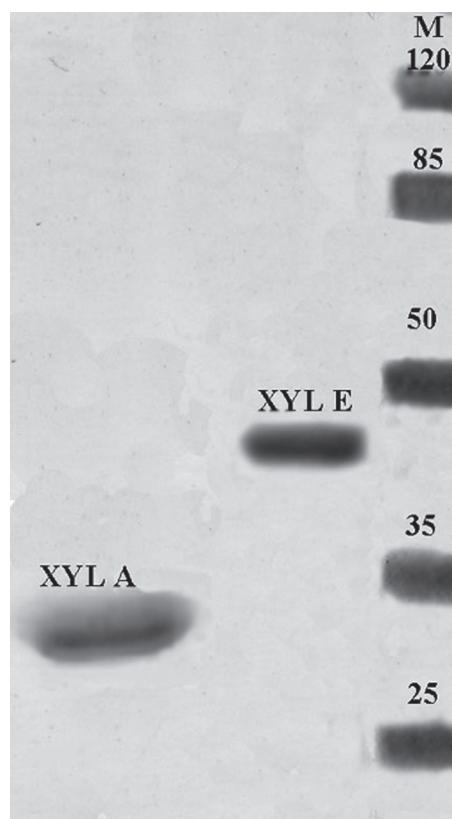


Рис. 1. Аналитический электрофорез в присутствии ДДС-Na очищенных ксиланаз *P. canescens* (M – маркеры молекулярной массы, кДа)

свойствам. В целом удельные активности XylA и XylE по глюкуроноксиану и арабиноксиану, а также такие важные характеристики ферментов, как pH- и температурный оптимумы активности, удовлетворительно согласуются с соответствующими параметрами для этих ксиланаз, описанными в литературе ранее [9, 11]. Однако в настоящей работе получены несколько более высокие значения констант Михаэлиса для XylA и XylE по обоим типам ксиланов, что может быть вызвано различием в структуре использованных в разных работах ксиланов.

На рис. 2 приведена кинетика гидролиза глюкуроноксиана и арабиноксиана под действием XylA и XylE в условиях, когда ферменты уравнины по активности в начальный момент реакции. Как видно из представленных данных, XylA обеспечивает заметно более высокий выход восстанавливающих сахаров при длительном гидролизе глюкуроноксиана, а XylE более эффективна при гидролизе арабиноксиана.

Помимо ферментативной активности, важным фактором, обуславливающим эффективность действия ксиланаз на ксиланы зерна злаков (таких, как рожь, ячмень, пшеница, овес), является их восприимчивость или устойчивость по отношению к белковым ингибиторам, содержащимся в этих

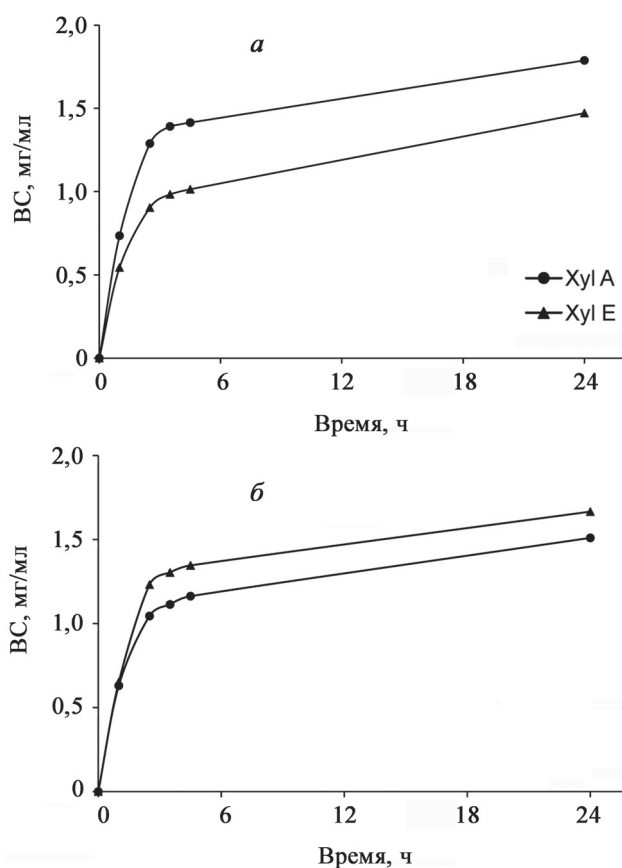


Рис. 2. Кинетика образования восстанавливающих сахаров (BS) при гидролизе глюкуронокси́лана (а) и арабинокси́лана (б) очищенными ксиланазами *P. canescens*. Концентрация субстрата 5 мг/мл, активность ферментов в реакционной смеси 0,075 Ед/мл, 40°C, рН 5,5

злаках. Такие ингибиторы были открыты сравнительно недавно (в 1997 г.), но только в последнее время при практическом применении ксиланаз этому фактору стали уделять особое внимание. В злаках содержатся два основных типа белковых ингибиторов ксиланаз, так называемые TAXI- и XIP-подобные ингибиторы [7]. Ингибиторы первого типа действуют только на ксиланазы, принадлежащие к 11-й семье гликозидгидролаз, тогда как ингибиторы второго типа способны ингибировать также и ксиланазы 10-й семьи, к которой относятся XylA и XylE *P. canescens*. Как правило, большинство грибных ксиланаз 10-й семьи подвержены действию XIP-подобных ингибиторов, тогда как устойчивость к ингибированию является скорее исключением, чем правилом [7]. Ранее в нашей лаборатории был разработан метод, позволяющий оценивать, насколько ферменты, способные гидролизовать ксилан из зерна ржи, подвержены действию содержащихся в нем белковых ингибиторов ксиланаз [14]. Метод основан на измерении изменения вязкости экстрактов ржи под действием конкретной ксиланазы, при этом используются два типа экстрактов: нативный (исходный) экстракт и

экстракт, подвергнутый кипячению для того, чтобы содержащиеся в нем белки-ингибиторы денатурировали. При этом все ксиланазы по определению способны снижать вязкость термоинактивированного экстракта, тогда как ферменты, подверженные действию ингибиторов, проявляют заметно меньшую вискозиметрическую активность при действии на нативный экстракт.

На рис. 3 приведены данные по снижению вязкости нативного и термоинактивированного экстрактов ржи под действием XylA и XylE. Представленные данные указывают на то, что XylE практически не ингибируется белками ржи; разница в уменьшении приведенной вязкости для нативного и термоинактивированного экстрактов составила лишь 5%. В случае XylA эта разница выражена намного более заметно (~30%). Ранее было показано, что бактериальные ксиланазы 10-й семьи, как правило, устойчивы к действию XIP-подобных ингибиторов. В случае ксиланазы Xyn10A из бактерии *Pseudomonas fluorescens cellulosa* за это свойство отвечает вставка из пяти аминокислотных остатков (рис. 4), которая образует удлиненную петлю между β_8 -листом и α_8 -спиралью у входа в активный центр фермента, стерически препятствуя связыванию в нем белка-ингибитора [15]. Эта вставка отсутствует у большинства грибных ксиланаз 10-й семьи, включая XylA из *P. canescens*, и присутствует только у ряда грибных ферментов данной семьи (рис. 4), включая Xyn10B и Xyn10C из *Myceliophthora thermophila* (*Chrysosporium lucknowense*) [14], Xyl II из *Aspergillus aculeatus* [15], а также XylE из *P. canescens*, устойчивость которой к XIP-подобным ингибиторам впервые продемонстрирована в настоящей работе.

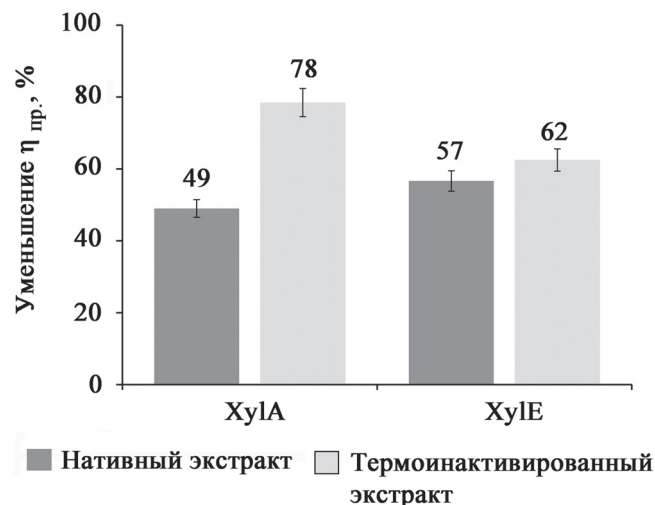


Рис. 3. Уменьшение приведенной вязкости нативного и термоинактивированного экстрактов ржи под действием очищенных XylA и XylE после 20 мин ферментативной обработки (0,1 М Na-ацетатный буфер, 40°C, рН 5,0)

Свойства очищенных ксиланаз XylA и XylE из *P. canescens*

Свойство	XylA	XylE	Ссылки
Удельная активность по глюкуроноксиану (Ед/мг)	29	50	[9, 11]
	31	41	настоящая работа
Удельная активность по арабиноксиану (Ед/мг)	24	55*	[9, 11]
	30	59	настоящая работа
рН-оптимум	5,3–5,7	5,5–6,0	[9, 11]
	5,0–6,0	5,7	настоящая работа
Температурный оптимум, °С	55	70	[9, 11]
	50	70	настоящая работа
K_m , г/л (глюкуроноксиан)	3,4	0,52	[9, 11]
	9,9	3,1	настоящая работа
K_m , г/л (арабиноксиан)	2,0	–	[9]
	11,9	1,8	настоящая работа

*Арабиноксиан из овса.

Таким образом, резюмируя данные, представленные выше, можно заключить, что XylE из *P. canescens* является весьма перспективным ферментом для использования в качестве добавки к комбикормам на основе злаков, поскольку она устойчива к действию белковых ингибиторов, присутствующих в этих злаках, а также обеспечивает более глубокую степень гидролиза араби-

ноксиана, чем XylA (как было отмечено во введении, арабиноксиан является основным некрахмальным полисахаридом в зерне злаков). В то же время XylA, которая более эффективно действует на глюкуроноксиан, являющийся компонентом лиственной древесины, по-видимому, может применяться для биоотбеливания целлюлозы, получаемой из такого вида древесины.

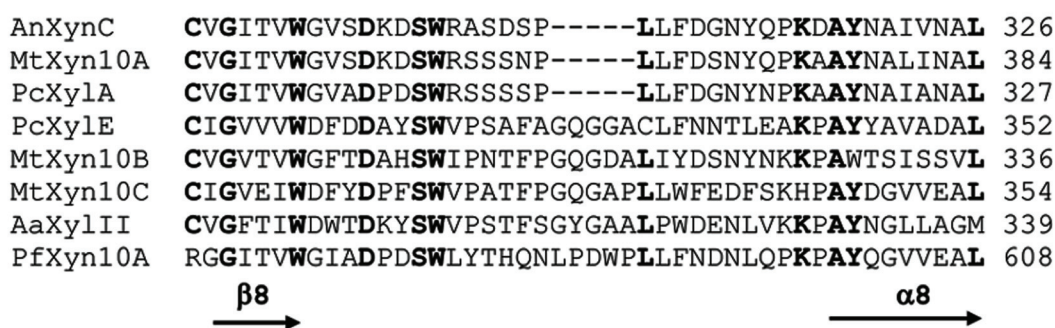


Рис. 4. Выравнивание фрагментов аминокислотных последовательностей ксиланаз из 10-й семьи гликозидгидролаз. AnXynC – ксиланаз C из *Aspergillus nidulans* (код доступа GenBank CAA90075); MtXyn10A, MtXyn10B, MtXyn10C – ксиланазы I, III и IV из *Myceliophthora thermophila* (*Chrysosporium lucknowense*) (ACH15005, AEN99941, AEO58598); PcXylA, PcXylE – XylA и XylE из *P. canescens* (AAV65488, ACP27611); AaXylIII – ксиланаз II из *A. aculeatus* (AAE62343); PfXyn10A – ксиланаз A из *Pseudomonas fluorescens cellulosa* (CAA33469)

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (идентификационный номер проекта RFMEFI60714X0050). В работе использовалось научное оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» ИНБИ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prade R.A. // Biotech. Genet. Eng. Rev. 1996. Vol. 13. N 1. P. 100.
2. Kulkarni N., Shendye A., Rao M. // FEMS Microbiol. Rev. 1999. Vol. 23. N 4. P. 411.
3. Liab K., Azadi P., Collins R., Tolan J., Kim J., Eriksson, K. // Enzyme Microb. Technol. 2000. Vol. 27. N 1–2. P. 89.
4. Coughlan M.P., Hazlewood G.P. // Hemicellulose and Hemicellulases. London-Chapel Hill, 1993. P. 120.
5. Collins T., Gerday C., Feller G. // FEMS Microbiol. Rev. 2005. Vol. 29. N 1. P. 3.
6. Manji A.H. // Tappi J. 2006. Vol. 5. N 1. P. 23.
7. Гусаков А.В. // Биохимия. 2010. Т. 75. № 10. С. 1331.
8. Серебряный В.А., Вавилова Е.А., Чулкин А.М., Винецкий Ю.П. // Прикл. биохим. микробиол. 2002. Т. 38. № 5. С. 495.
9. Сеницына О.А., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Серебряный В.А., Вавилова Е.А., Винецкий Ю.П., Сеницын А.П. // Биохимия. 2003. Т. 68. № 12. С. 1631.
10. Майсурадзе И.Г., Чулкин А.М., Вавилова Е.А., Беневоленский С.В. // Генетика. 2011. Т. 47. № 2. С. 174.
11. Федорова Т.В., Чулкин А.М., Вавилова Е.А., Майсурадзе И.Г., Трофимов А.А., Зоров И.Н., Хотченков В.П., Поляков К.М., Беневоленский С.В., Королева О.В., Ламзин В.С. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 10. С. 1433.
12. Smith B.E. // Protein Sequencing Protocols. Totowa, 1997. P. 368.
13. Сеницына О.А., Бухтояров Ф.Е., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Винецкий Ю.П., Сеницын А.П. // Биохимия. 2003. Т. 68. № 11. С. 1494.
14. Gusakov A.V., Ustinov B.B. // Ind. Biotechnol. 2009. Vol. 5. N 2. P. 104.
15. Flatman R., McLauchlan W.R., Juge N., Furniss C., Berrin J.-G., Hughes R.K., Manzanarez P., Ladbury J.E., O'Brien R., Williamson G. // Biochem. J. 2002. Vol. 365. N 3. P. 773.

Поступила в редакцию 01.08.15

COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF XYLANASES XylA AND XylE FROM THE FUNGUS *Penicillium canescens*

Y.A. Denisenko, D.A. Merzlov, A.V. Gusakov, A.V. Chekushina, A.P. Sinitsyn

(A.N. Bakh Institute of Biochemistry, Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia)

Two xylanases (XylA and XylE), belonging to family 10 of glycoside hydrolases, were isolated from an enzyme preparation produced by the fungus *Penicillium canescens*. Kinetics of glucuronoxylan and arabinoxylan hydrolysis, as well as the influence of proteinaceous (XIP-like) inhibitors from rye on the XylA and XylE activity, were studied. XylA provided more complete conversion of glucuronoxylan than XylE, while XylE was more effective in hydrolysis of arabinoxylan. Unlike XylA, XylE was resistant to rye proteinaceous inhibitors, the property rarely met among the family 10 enzymes. Thus, XylE is a perspective enzyme for application as a cereal feed additive, while XylA may potentially be used for biobleaching of cellulose from hardwoods, which contain glucuronoxylan as one of major components.

Key words: xylanase, *Penicillium canescens*, proteinaceous inhibitors, xylan, hydrolysis kinetics.

Сведения об авторах: Денисенко Юрий Андреевич – аспирант лаборатории биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН (denisenko.yura@mail.ru); Мерзлов Дмитрий Андреевич – аспирант химического факультета МГУ (dmitriymerzlov@gmail.com); Гусаков Александр Васильевич – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ и лаборатории биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, докт. хим. наук, профессор (avgusakov@enzyme.chem.msu.ru); Чекушина Анна Вячеславовна – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, канд. хим. наук chekushina.ann@gmail.com; Сеницын Аркадий Пантелеймонович – зав. лабораторией физико-химии ферментативной трансформации полимеров кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ и зав. лабораторией биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, докт. хим. наук, профессор (apsinitsyn@gmail.com).