

## НОВЫЙ ПРОДУЦЕНТ КОМПЛЕКСА ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ БИОДЕСТРУКЦИИ КСАНТАНА: ПОЛНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ IN VITRO И ВОЗМОЖНЫЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

С.В. Швецова<sup>1,2,3</sup>, Л.В. Юрченко<sup>1</sup>, Е.В. Журишкина<sup>1,3</sup>, К.С. Бобров<sup>1,3</sup>, А.А. Кульминская<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия,

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Курчатовский геномный центр-ПНФ, Гатчина, Россия

### ВВЕДЕНИЕ

Ксантановая камедь (ксантан) – это анионный полисахарид, широко применяемый в различных областях промышленности. По химической структуре молекула ксантана имеет целлюлозный остов и линейные боковые цепи, состоящие из маннозил–глюкуронил–маннозных субъединиц, последовательно присоединенных в О-3-положении к некоторым глюкозильным остаткам остова [1]. Кроме того, внутренние и терминальные остатки маннозы в боковых цепях могут быть модифицированы посредством пируватных и ацетильных групп. Востребованность данного биополимера обусловлена его уникальными свойствами: отличная загущающая способность, высокая вязкость раствора при низкой концентрации, устойчивость к биоразложению, стабильность в широком диапазоне температур, pH, солености и давления. Перечисленные параметры делают его привлекательным, например, для пищевой, фармацевтической, медицинской, нефтяной промышленности [2, 3]. Ксантан широко используется в процессе повышения нефтеотдачи в качестве добавки к буровому раствору и активно применяется при бурении нефтяных скважин в Европе и США [2]. Детальные знания о возможностях частичной или полной деструкции, а также модификации физико-химических свойств высокостабильного полимера ксантана при помощи ферментов микроорганизмов являются на сегодня недостающим звеном в рамках его успешного использования. Задачи по утилизации отработанных буровых растворов с использованием ксантана, а также применение полисахарида на некоторых этапах нефтедобычи делают актуальным поиск новых перспективных микроорганизмов, способных деградировать ксантан, а значит, и исследование ферментных систем на их основе [4]. Уменьшение молекулярной массы или изменение структуры биополимера при помощи ферментных препаратов может позволить применять полученные продукты в новых биотехнологических отраслях [5] или же станет быстрым и безопасным способом утилизации биополимера, что важно с точки зрения экологии и природоохранных вопросов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Скрининг продуцентов ксантан-деградирующего комплекса ферментов осуществляли с использованием коллекции микроорганизмов (бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы) лаборатории энзимологии Отделения молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» – ПНФ, а также полученных в рамках исследования новых изолятов. Для поиска требуемых активностей, штаммы культивировали на жидкой и / или твердой (1,5 % агара) среде с ксантаном (0,3 % ксантана, 0,1 % пептона в растворе минеральных солей) при 28 °C. В результате скрининга были отобраны 1 перспективный штамм, способный гидролизовать ксантан. Морфологию клеток наблюдали с использованием световой микроскопии. Генетическую идентификацию штамма выполняли путем ПЦР-амплификации гена 16S рРНК с использованием набора праймеров 8F и 1492R [6].

Влияние источников углерода на рост клеток и продукцию ксантан-деградирующих ферментов штамма X1 осуществляли на средах с различными углеводсодержащими компонентами (0,3 % (вес/об.) ксантан, 0,5 % (вес/об.) ксантан или по 1 % (вес/об.) глюкоза, водорастворимый крахмал, сахароза, лактоза, карбоксиметилцеллюлоза, манноза, альгинат, хитозан, каррагинан) и культивировали при 28 °C, 150 об/мин на шейкере. Для исследования влияния источников азота, изолят X1 культивировали в течение суток на среде с ксантаном для получения инокулята, а затем клетки переносили на среды с 0,3 % (вес/об.) ксантана и 0,1 %-ным содержанием (вес/об.) различных источников азота, таких как триптон, дрожжевой экстракт, пептон, бычий экстракт, мочевины, нитрат аммония и сульфат аммония.

Концентрацию клеток в процессе роста культуры измеряли при 600 нм. Измерение ферментативной активности внеклеточных ферментов выполняли с использованием культуральной жидкости в качестве грубого ферментного препарата.

Концентрированный ксантан-деградирующий ферментный препарат получали путем осаждения сульфатом аммония супернатанта культуральной жидкости (степень насыщения 70 % (вес/об.)); осадок растворяли и диализовали в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 6,5. Активность внутриклеточных ферментов измеряли после вскрытия клеток ультразвуком, предварительно обработанных лизоцимом в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 6,5. Освобождение восстанавливающих сахаров в процессе роста изолята на среде с ксантаном, а также в реакционной смеси определяли с использованием метода РАНВАН [7]. Активность ксантан лиазы определяли по увеличению величины поглощения при 235 нм [8]. Измерение активности секретируемых и внутриклеточных экзо-гликозидаз осуществляли с использованием хромофорных п-нитрофенил (пНФ) гликозидов: пНФ- $\alpha$ -D-маннопиранозид, пНФ- $\beta$ -D-глюкопиранозид, пНФ-целлобиозид. Измерение вязкости осуществляли с использованием вискозиметра Brookfield DV2T-LV. Мониторинг образования продуктов разложения ксантана в реакционной смеси осуществляли с использованием тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе бутанол / уксусная кислота/ вода (2:1:1, об./об./об.).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе поиска продуцентов, обладающих ферментной системой для эффективной биодеструкции ксантана, был обнаружен и изолирован штамм бактерии X1, способный расти на среде с ксантаном. Основываясь на снижении вязкости в растворе ксантана, высвобождении ксантоолигосахаридов и обнаружении ферментативной активности, было определено, что штамм X1 является ксантаноразлагающей бактерией (рис. 1). Исходя из полученных предварительных данных, а также основываясь на знаниях о структуре биополимера ксантана, было сделано предположение о наличии у нового штамма X1 собственного ксантанолитического комплекса ферментов. Данный комплекс, теоретически, должен включать такие ключевые ферменты, как ксантан лиаза (КФ 4.2.2.12, PL8),  $\alpha$ -маннозидаза (КФ 3.2.1.24, GH38),  $\beta$ -глюкозидазу (КФ. 3.2.1.21), глюкуронидаза, а также возможно присутствие фермента эндо-действия, специфичного в отношении полимерной цепи ксантана. Глюканазы, специфичные как ксантаназы эндо-типа, обнаружены у некоторых штаммов бактерий, способных к биодеструкции ксантана [9, 10]. Было показано, что в полученном нами ферментном препарате из изолята X1 при росте на среде с ксантаном, имеются активности ксантан лиазы,  $\alpha$ -маннозидазы,  $\beta$ -глюкозидазы, а также другие гидролитические активности. Было установлено, что ксантан лиаза проявляет максимальную активность в области pH 5,0–6,0, при проведении реакции при температуре 37 °C.

Новый изолят X1 был идентифицирован на основе микробиологических и генетических методов как представитель рода *Raenibacillus* sp. X1. Для полученного нового продуцента *Raenibacillus* sp. X1 было оценено влияние источников углерода и азота на рост клеток и продукцию ксантан-деградирующих ферментов. Показано, что среди протестированных источников азота, добавление в среду пептона в количестве 0,1 % являлось наиболее оптимальным для роста и выработки требуемого комплекса ферментов.

На выбранной среде ХР был исследован пул секретируемых и внутриклеточных активностей ксантанолитического комплекса ферментов нового продуцента X1. Раствор ксантана (0,3 % вес/об.) обрабатывали внеклеточными и внутриклеточными ферментными препаратами, полученными при росте на жидкой среде ХР. Для этого, в процессе роста культуры ежедневно отбирали аликвоты культуральной жидкости, центрифугировали, клетки вскрывали для получения внутриклеточных ферментов. Действие ферментов и наличие образующихся продуктов реакции отслеживали по изменению вязкости раствора ксантана и количеству восстанавливающих сахаров в реакционной смеси, а также при помощи ТСХ-анализа реакционной смеси. На рисунке 2 представлена динамика образования продуктов биодеградции ксантана различными фракциями ферментов из изолята X1. Видно, что при действии секретируемых (внеклеточных) и внутриклеточных ферментов на ксантан, спектр продуктов различен. Активность внутриклеточных ферментов достигает максимума на 3–4-е дни роста культуры, тогда как активность секретируемых ферментов в культуральной жидкости – на 4–5-е дни. Вероятно, это связано с тем, что часть ферментов, задействованных в полной биодеструкции ксантана, являются внутриклеточными. Полученные данные хорошо согласуются с недавно опубликованными результатами по протеомному исследованию ксантан-деградирующего пула ферментов у бактерии *Microbacterium* sp. XT11 [9]. Пятно, отмеченное стрелкой (рис. 2), вероятно, является маннозой с пироватной группой и отщепляется ксантан лиазой.

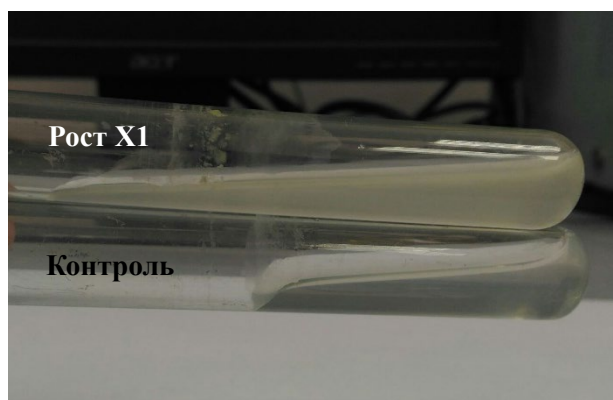


Рисунок 1 – Снижению вязкости раствора ксантана новой ксантаноразлагающей бактерией X1

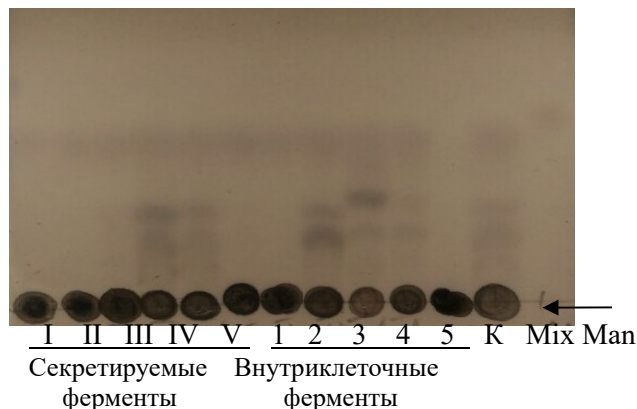


Рисунок 2 – ТСХ-анализ реакции расщепления ксантана грубым ферментным препаратом. I–V / 1–5 – день роста культуры, Mix – смесь секретируемых и внутриклеточных ферментов на 5-й день роста; Man — манноза

На следующем этапе был получен концентрированный ферментный препарат для обработки ксантана. При анализе реакционной смеси, инкубируемой при 37 °C в течение 9-ти часов, методом ТСХ в было показано высвобождение и увеличение концентрации во времени ксантоолигосахаридов и других низкомолекулярных продуктов, а также существенное снижение вязкости 0,3 %-го раствора ксантана (рис. 3). Итогом проводимого эксперимента была полное разрушение биополимера (не показано на рисунке), что указывает на большой потенциал полученного ферментного препарата.

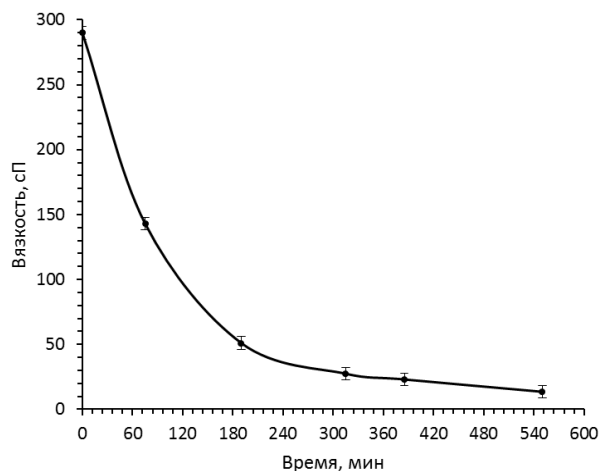
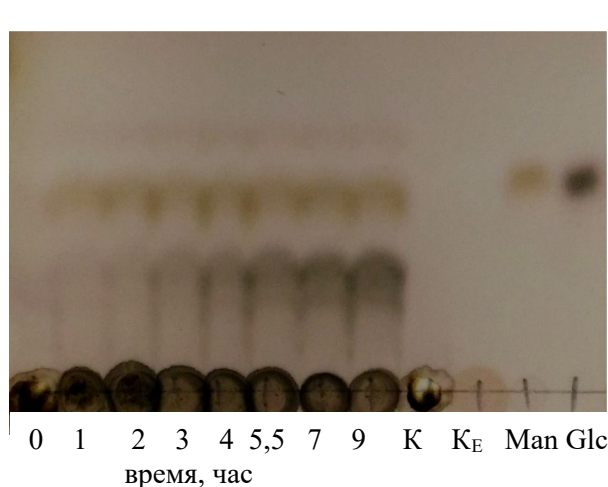


Рисунок 3 – Динамика биодеструкции ксантана (E415) концентрированной фракцией ферментного препарата, секретируемого изолятом X1. ТСХ-анализ реакции расщепления ксантана (0,3 % (вес/об.)) и образование низкомолекулярных продуктов (слева) и кривая снижения вязкости ксантана во времени (вискозиметр Brookfield DV2T-LV, насадка 42Z, 3 гpm, 1 мл образца) (справа). 0 – нулевая точка реакции; 1, 2, 3, 4, 5,5, 7, 9 – время реакции, часы; K – контроль ксантана; K<sub>E</sub> – контроль ферментного препарата; Man – манноза; Glc – глюкоза.

Дальнейшее изучение разнообразия ферментов и их особенностей из нового изолята X1, а также оптимизация методики ферментативной обработки ксантана представляет собой как актуальную задачу прикладного характера, поскольку разработка эффективного и недорогого «коктейля» ферментов для быстрого разложения биополимера крайне важна. Кроме этого, исследование биохимических особенностей каждого из ключевых ферментов для биодеструкции ксантана в отдельности имеет значимую фундаментальную роль и позволит расширить современные представления о роли и функциях этих ферментов, а также поможет усовершенствовать или получить новые биокатализаторы с требуемыми свойствами.

По полученным результатам можно заключить, что нами выделен ксантан-деградирующий штамм бактерии *Paenibacillus* sp. XI, который способен деполимеризовать высокостабильный биополимер, приводя к снижению вязкости раствора ксантана и изменению его химической структуры. Ферментная система, производимая штаммом XI, имеет большой потенциал для применения в процессах повышения нефтеотдачи пластов и бурения нефтяных скважин для модификации структуры биополимера. Кроме того, концентрированный ферментный препарат имеет большие перспективы при разработке и оптимизации подходов к решению задачи полной утилизации отработанного ксантан-содержащего бурового раствора, закачиваемого в подземные нефтяные скважины.

**Работа выполнена при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, Соглашение No. 075–15–2019–1663.**

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Becker A. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective / Becker A., Katzen F., Pühler A., Ielpi L. // *Applied Microbiology and Biotechnology* – 1998. – Т. 50 – № 2 – С. 145–152.
2. Echt T. Impact of the drilling fluid system on the effectiveness of a high pressure jetting assisted rotary drilling system / Echt T., Stoxreiter T., Plank J. // *Heliyon* – 2020. – Т. 6 – № 6 – С.e04179.
3. Kumar A. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review / Kumar A., Rao K.M., Han S.S. // *Carbohydrate Polymers* – 2018. – Т. 180 – С. 128–144.
4. Chen X. Isolation and characterization of xanthan-degrading *Enterobacter* sp. nov. LB37 for reducing the viscosity of xanthan in petroleum industry / Chen X., Wang M., Yang F., Tang W., Li X. // *World Journal of Microbiology & Biotechnology* – 2014. – Т. 30 – № 5 – С. 1549–1557.
5. Chen Q. Low molecular weight xanthan gum suppresses oxidative stress-induced apoptosis in rabbit chondrocytes / Chen Q., Shao X., Ling P., Liu F., Shao H., Ma A., Wu J., Zhang W., Liu F., Han G., Wang F. // *Carbohydrate Polymers* – 2017. – Т. 169 – С. 255–263.
6. Weisburg W.G. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. / Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. // *Journal of Bacteriology* – 1991. – Т. 173 – № 2 – С. 697–703.
7. Lever M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates / Lever M. // *Analytical Biochemistry* – 1972. – Т. 47 – № 1 – С. 273–279.
8. Jensen P.F. Structure and Dynamics of a Promiscuous Xanthan Lyase from *Paenibacillus nanensis* and the Design of Variants with Increased Stability and Activity / Jensen P.F., Kadziola A., Comamala G., Segura D.R., Anderson L., Poulsen J. – C.N., Rasmussen K.K., Agarwal S., Sainathan R.K., Monrad R.N., Svendsen A., Nielsen J.E., Lo Leggio L., Rand K.D. // *Cell Chemical Biology* – 2019. – Т. 26 – № 2 – С. 191–202.e6.
9. Sun Z. Proteomic Analysis of the Xanthan-Degrading Pathway of *Microbacterium* sp. XT11 / Sun Z., Liu H., Wang X., Yang F., Li X. // *ACS omega* – 2019. – Т. 4 – № 21 – С. 19096–19105.
10. Ashraf S. Production of Xanthanases by *Paenibacillus* spp.: Complete Xanthan Degradation and Possible Applications / Ashraf S., Soudi M.R., Ghadam P. // *Iranian Journal of Biotechnology* – 2017. – Т. 15 – № 2 – С. 120–127.