

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
Gamtos mokslų fakultetas  
Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

Julija GERASIMOVA

Magistrinis darbas

***Geobacillus thermodenitrificans* JK1 kamieno  
termostabilios ksilanazės geno klonavimas, ekspresija ir  
fermento savybių analizė**

Darbo vadovė  
Dr. N. Kuisienė

Vilnius 2011

*Geobacillus thermodenitrificans* JK1 kamieno termostabilios ksilanazės geno  
klonavimas, ekspresija ir fermento savybių analizė

Darbas atliktas Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje

Julija Gerasimova

Darbo vadovė:

Dr. Nomedė Kuisienė

## TURINYS

Santrumpos .....	5
ĮVADAS .....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	7
1.1 Ksilanas .....	7
1.2 Ksilanazių klasifikacija .....	8
1.3 Ksilanazių struktūra .....	10
1.4 Ksilanazių biosintezės reguliacija .....	12
1.5 Glikozidhidrolazių katalitinis mechanizmas .....	12
1.6 Termofilinių bakterijų ksilanazės .....	13
1.7 <i>Geobacillus</i> genties bakterijų ksilanazės .....	14
1.8 Ksilanazių panaudojimas .....	15
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	17
2.1 MEDŽIAGOS .....	17
2.1.1 Reagentai .....	17
2.1.2 Bakterijų kamienai .....	18
2.1.3 Mitybinės terpės .....	18
2.1.4 Tirpalai ir buferiai .....	18
2.2 METODAI .....	18
2.2.1 Termofilinių bakterijų skyrimas .....	18
2.2.2 Ksilanaziniu aktyvumu pasižyminčių termofilinių bakterijų atranka .....	18
2.2.3 Ksilanolizinių fermentų produkcija laukiniame JK1 kamiene .....	19
2.2.4 Ksilanolizinio aktyvumo nustatymas šulinėlių metodu .....	19
2.2.5 Baltymų nusodinimas amonio sulfatu .....	19
2.2.6 Bakterijų genomines DNR skyrimas .....	19
2.2.7 Ksilanazių genų paieška PGR metodu .....	19
2.2.8 PGR produkto sekoskaita .....	20
2.2.9 16S rDNR amplifikavimas .....	20
2.2.10 16S rDNR PGR produkto valymas .....	20
2.2.11 16S rDNR klonavimas .....	20
2.2.12 Plazmidinės DNR skyrimas .....	20
2.2.13 16S rDNR sekų kompiuterinė analizė .....	20
2.2.14 Filogenetinė analizė .....	21
2.2.15 <i>spo0A</i> geno amplifikavimas ir filogenetinė analizė .....	21
2.2.16 Elektrokompentinių <i>E. coli</i> ląstelių paruošimas .....	21
2.2.17 Ksilanazės geno amplifikavimas .....	21
2.2.18 Ksilanazės geno klonavimas į pJET1.2/blunt klonavimo vektorių .....	21
2.2.19 Ksilanazės geno iškirpimas .....	22
2.2.20 Ksilanazės geno klonavimas į pET-28c(+) ekspresijos vektorių .....	22
2.2.21 Rekombinantinės ksilanazės ekspresijos optimizavimas .....	22
2.2.22 <i>E. coli</i> ląstelių suardymas ultragarsu .....	22
2.2.23 Rekombinantinės ksilanazės gryninimas .....	22
2.2.24 Baltymų dializė .....	22
2.2.25 Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu .....	23
2.2.26 NDS-PAGE analizė .....	23
2.2.27 Zimogramos analizė .....	23
2.2.28 Fermentinio aktyvumo nustatymas DNS metodu .....	23
2.2.29 pH įtaka ksilanaziniam aktyvumui .....	23
2.2.30 Temperatūros įtaka ksilanaziniam aktyvumui .....	23
2.2.31 Metalų jonų įtaka ksilanaziniam aktyvumui .....	24
2.2.32 Substrato specifiškumo nustatymas .....	24
2.2.33 Rekombinantinės ksilanazės termostabilumo nustatymas .....	24

3. REZULTATAI.....	25
3.1 Termofilinių bakterijų, pasižyminčių ksilanaziniu aktyvumu, paieška ir atranka .....	25
3.2 Ksilanolizinių fermentų sintezė JK1 kamiene .....	25
3.3 Baltymų skyrimas iš JK1 kamieno.....	25
3.4 JK1 kamieno ksilanolizinių fermentų zimograma .....	26
3.5 16S rRNR geno sekų palyginimas ir filogenetinis medis.....	26
3.6 <i>spo0A</i> geno sekų palyginimas ir filogenetinė analizė .....	27
3.7 Ksilanazės geno paieška .....	28
3.8 Ksilanazės geno klonavimas ir rekombinantinės ksilanazės konstravimas .....	28
3.9 Rekombinantinės ksilanazės ekspresija ir gryninimas .....	30
3.10 Rekombinantinės ksilanazės charakteristika .....	31
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	33
IŠVADOS.....	36
SANTRAUKA.....	37
SUMMARY .....	38
PADEKA.....	39
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	40

## Santrumpos

APS	amonio persulfatas
DMSO	dimetilsulfoksidas
DNS	3,5-dinitrosalicilo rūgštis
EDTA	etilendiamintetraacto rūgštis
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozidas
kDa	kilodaltonas
NCBI	Nacionalinis Biotechnologinės Informacijos Centras (angl. <u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> io <u>t</u> echnology <u>I</u> nformation)
NDS	natrio dodecilsulfatas
OT	optinis tankis
PAGE	poliakrilamidinio gelio elektroforezė
PGR	polimerazės grandininė reakcija
TEMED	tetrametiletildiaminas
Tris	tris(hidroksimetil)aminometanas
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopiranozidas

## IVADAS

Ilgą žmonijos gyvavimo laikotarpį iškastinis kuras buvo ne tik energijos šaltinis, bet ir viena svarbiausių chemijos pramonės žaliavų. Senkant jo ištekliams ir tuo pačiu didėjant vartojimo poreikiams bei su tuo susijusiai aplinkos taršai, pradėti atsinaujinančių energijos, žaliavų šaltinių naudojimo technologijų tyrimai ir kūrimas. Augalų sintetinių polisacharidų, tokių kaip celiuliozė ir hemiceliuliozė, biokonversija į kurą arba pramoninę reikšmę turinčias medžiagas – viena perspektyviausių sričių.

Ksilanas yra vienas iš dažniausiai gamtoje sutinkamų polisacharidų, jis yra pagrindinė hemiceliuliozės sudedamoji dalis. Efektyviai ksilano degradacijai reikalingas sinergetinis poveikis įvairių ksilanolizinių fermentų, tokių kaip endo-ksilanazės,  $\beta$ -ksilozidazės,  $\alpha$ -gliukuronidazės,  $\alpha$ -arabinofuranozidazės ir esterazės (Hwang ir kt., 2010). Šiuos fermentus sintetina įvairioms sisteminėms grupėms priklausantys prokariotiniai ir eukariotiniai mikroorganizmai. Svarbiausią vaidmenį iš visų ksilano degradacijoje dalyvaujančių fermentų atlieka endo-1,4- $\beta$ -ksilanazės, nes jos inicijuoja ksilano polimero skaidymą iki ksilooligosacharidų. Šis procesas turi platų pritaikymą popieriaus ir maisto pramonėje bei pašarų gamyboje (Collins ir kt., 2005). O pastaraisiais metais ypač didelio dėmesio sulaukė potencialus ksilanazių panaudojimas biokuro pramonėje (Dodd ir Cann, 2009; Chatterjee ir kt., 2010).

Fermentai ne visada pasižymi tokiomis savybėmis, kurios užtikrintų jų sėkmingą pritaikymą pramoniniuose procesuose. Ribojančiais veiksniais gali būti nepakankamas fermento procesyvumas, efektyvus veikimas tik siaurose pH ribose ar siaurame temperatūrų intervale. Todėl naujų fermentų paieška yra aktuali ir aktyviai plėtojama sritis, ypatingą dėmesį skiriant termofilinių prokariotų fermentų paieškai, kadangi jie pasižymi unikaliomis savybėmis: termostabilumu, atsparumu denatūracijai ir proteolizei. Tuo remiantis ir buvo suformuluotas **darbo tikslas** – termofilinių bakterijų ksilanazių paieška, geno klonavimas ir fermento savybių nustatymas.

Darbo tikslui įgyvendinti keliami **uždaviniai**:

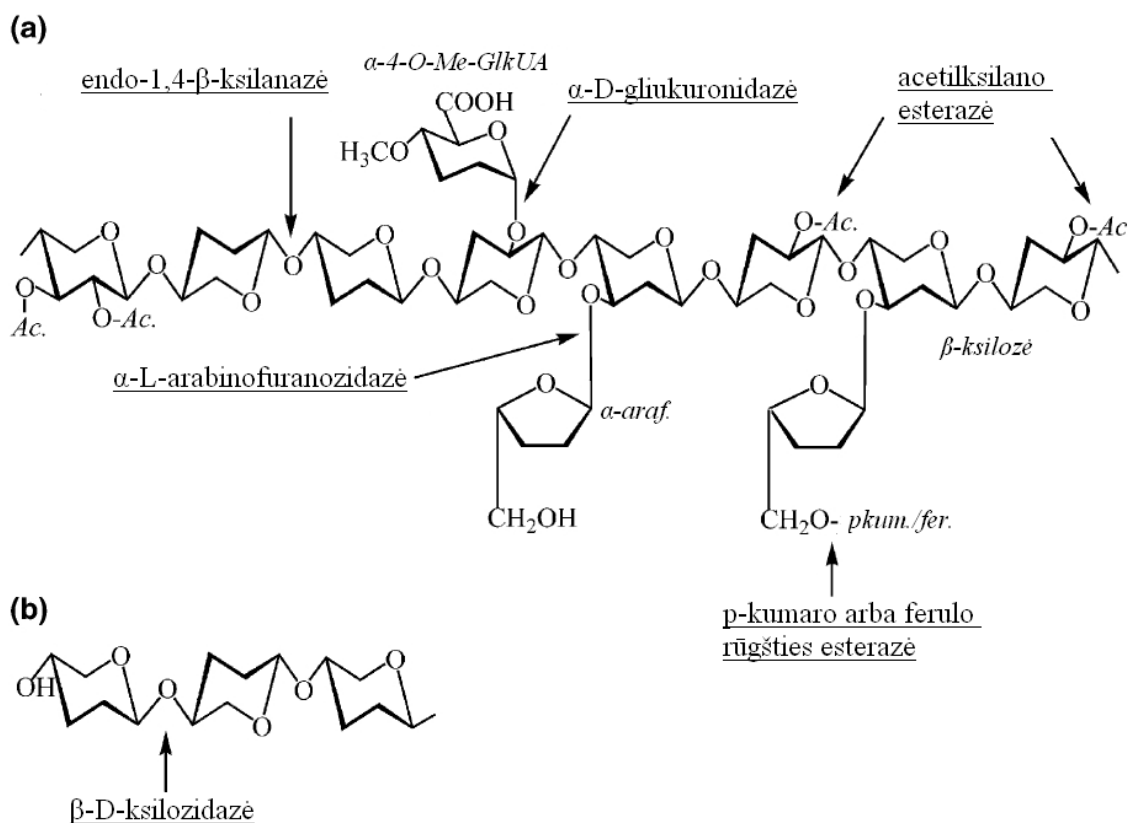
1. Termostabilių ksilanazių producentų paieška.
2. Ksilanazės geno klonavimas ir ekspresija *E. coli* ląstelėse.
3. Rekombinantinio fermento savybių nustatymas.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Ksilanas

Ksilanas kartu su celiulioze ir ligninu yra pagrindiniai augalų ląstelių sienelių struktūriniai komponentai sąveikaujantys tarpusavyje kovalentiniais ir nekovalentiniais ryšiais. Manoma, jog šių polimerų formuojamose struktūrose ksilanas atlieka jungiančią funkciją užtikrindamas augalų ląstelių sienelių vientisumą (Dhiman ir kt., 2008). Tai pagrindinis hemiceliuliozės komponentas ir antras pagal paplitimą polisacharidas gamtoje, sudarantis apytiksliai vieną trečiąją dalį atsinaujinančios organinės anglies Žemėje (Saha, 2003).

Daugiausiai ksilano randama gaubtasėklių augalų kietmedyje (15-30 % ląstelių sienelių sudėties), mažiau plikasėklių augalų medienoje (7-10 %) (Collins ir kt., 2005). Ksilanas dažniausiai būna lokalizuotas antrinėje augalų ląstelių sienelėje, tačiau kartais randamas ir pirminėje sienelėje. Ksilano struktūra įvairuoja tarp skirtingų augalų rūšių:  $\beta$ -1,4-D-ksilopiranozilo vienetai, kurie sudaro pirminę homopolimerinę grandinę, gali būti pakeisti šoninės gradinės gliukuronopiranozilo, 4-O-metil-D-gliukuronopiranozilo,  $\alpha$ -L-arabinofuranozilo, acetilo, ferulolo ir *p*-kumarolo grupėmis (1.1 pav.) (Beg ir kt., 2001).



**1.1 pav.** (a) Ksilano struktūra ir fermentai dalyvaujantys jo hidrolizėje. (b) Ksilooligosacharidų hidrolizė vykdoma  $\beta$ -D-ksilozidazės (Collins ir kt., 2005).

Pavyzdžiui, kietmedyje ksilano molekulės sudarytos iš *O*-acetil-4-*O*-metilgliukuronoksilano, plikasėklių medienos ksilaną sudaro arabino-4-*O*-metilgliukuronoksilanas, o vienmečių augalų ksilanas dažniausiai būna arabinoksilanas (Collins ir kt., 2005). Linearizuotas, neturintis pakaitinių grupių ksilanas rečiau sutinkamas gamtoje. Jo randama esparto žolėje, tabako stiebuose bei kai kuriuose jūrų dumbliuose (Beg ir kt., 2001). Ksilano polimerizacijos laipsnis taip pat kinta priklausomai nuo medienos tipo, paprastai kietmedžio ksilaną sudaro 150-200 β-ksilopiranozinių liekanų ilgio grandinės, o plikasėklių medienos ksilaną – 70-130 (Saha, 2003).

Ksilanas, lyginant su kitais paplitusiais biologiniais polimerais, chemiškai gana heterogeniška bei kompleksiška medžiaga, kurios efektyviam degradavimui reikalingos multifermentinės sistemos (1.1 pav.). Tokios sistemos (pagrinde iš ksilanazių bei eilės kitų fermentų) pakankamai plačiai paplitusios tarp bakterijų ir grybų.

## 1.2 Ksilanazių klasifikacija

Pagrindiniai ksilano hidrolizėje dalyvaujantys fermentai yra **endo-1,4-β-ksilanazės** (EC 3.2.1.8) ir **endo-1,3-β-ksilanazės** (EC 3.2.1.32), kurie atsitiktinai skelia atitinkamai (1→4)-β-D-ksilozidinius ir (1→3)-β-D-glikozidinius ryšius ksilano polimere. Ksilano degradacijoje dalyvauja ir visa eilė kitų fermentų: **β-D-ksilozidazės** (EC 3.2.1.37) - atskelia ksilozės monomerus nuo trumpų ksilooligosacharidų bei ksilobiozės; **α-L-arabinofuranozidazės** (EC 3.2.1.55), **α-D-gliukuronidazės** (EC 3.2.1.139), **acetilksilano esterazės** (EC 3.2.1.72), **ferulo rūgšties esterazės** (EC 3.1.1.73) ir **p-kumaro rūgšties esterazės** (EC 3.1.1.-) - katalizuoja šoninių grupių pašalinimą.

Ksilanazių įvairovę, jų fizikochemines savybes, struktūras bei specifinius aktyvumus lemia jų substrato ksilano heterogeniškumas ir kompleksiškas. Pirma šių fermentų klasifikacija buvo pasiūlyta Wong ir bendraautorių 1988 metais. Ši klasifikacija buvo pagrįsta ksilanazių fizikocheminėmis savybėmis. Tokiu būdu, jos buvo suskirstytos į 2 grupes: mažos molekulinės masės (<30 kDa) ir šarminio *pI*, bei didelės molekulinės masės (>30 kDa) ir rūgštinio *pI*. Tačiau, atsirado daug išimčių, kurias pagrinde sudarė grybinės prigimties ksilanazės, kurios negali būti klasifikuojamos pagal šią sistemą.

Šiuo metu taikoma tobulesnė klasifikacijos sistema, leidžianti sugrupuoti ne tik ksilanazes, bet ir bendrai visas glikozidazes (EC 3.2.1.x) bei nustatyti evoliucinius ryšius tarp šių fermentų. Ši sistema remiasi pirminės struktūros katalitinių domenų palyginimais ir grupuoja glikozidhidrolazes į šeimas pagal giminingas aminorūgščių sekas (Cantarel ir kt., 2008). Fermentai priklausantys tai pačiai šeimai turi panašią trimatę struktūrą ir molekulinis mechanizmus, bei manoma, kad jie turi panašius specifiškumus mažiems, tirpiems, sintetiniams



substratams (Collins ir kt., 2005). Be to, kai kurios glikozidhidrolazių šeimos turinčios giminingas trimates struktūras gali būti grupuojamos į „klanus“ (GH-A – GH-N).

Glikozidhidrolazių klasifikacijos sistemoje dauguma ksilanazių yra priskiriamos 10 ir 11 šeimoms. Tačiau fermentai pasižymintys ksilanaziniu aktyvumu dar randami 5, 8, 16, 26, 43, 52 ir 62 šeimose. Pagal CAZy (carbohydrate-active enzymes) duomenų bazę, katalitinius domenų su 1,4- $\beta$ -ksilanaziniu aktyvumu turi tik fermentai priklausantys 5, 8, 10, 11, 43 šeimoms. O 1,3- $\beta$ -ksilanaziniu aktyvumu pasižymintys fermentai randami tik 10 ir 26 šeimose. Kitoms šeimoms (16, 52 ir 62) priskiriami fermentai yra bifunkciniai, turintys du katalitinius domenų. Pavyzdžiui, *Ruminococcus flavefaciens* fermento vieną katalitinį domeną sudaro ksilanazė priklausanti 11 šeimai, o kitą – lichenazė iš 16 šeimos (Collins ir kt., 2005). Šis bifunkcinis fermentas priskiriamas abiem šeimoms. Žemiau yra trumpai pateiktos aukščiau minėtų glikozidhidrolazių šeimų charakteristikos.

**5 glikozidhidrolazių šeima** yra laikoma viena didžiausių, nes visi jai priklausantys fermentai pasižymi labai skirtingais aktyvumais, ir tik septynios aminorūgščių liekanos yra konservatyvios tarp visų šios šeimos atstovų (Collins ir kt., 2005). Ksilanazės (EC 3.2.1.8) priklausančios šiai šeimai skiriasi substrato specifiškumu: kai kurios yra specifiškos tik ksilanui, o kitos gali turėti tiek karboksimetilceliuliazinį, tiek ir ksilanazinį aktyvumus (Collins ir kt., 2005). 5 šeimos trimatę katalitinio domeno struktūrą sudaro  $(\alpha/\beta)_8$  statinė (1.2 pav., (a)). Ši šeima priskiriama GH-A klanui.

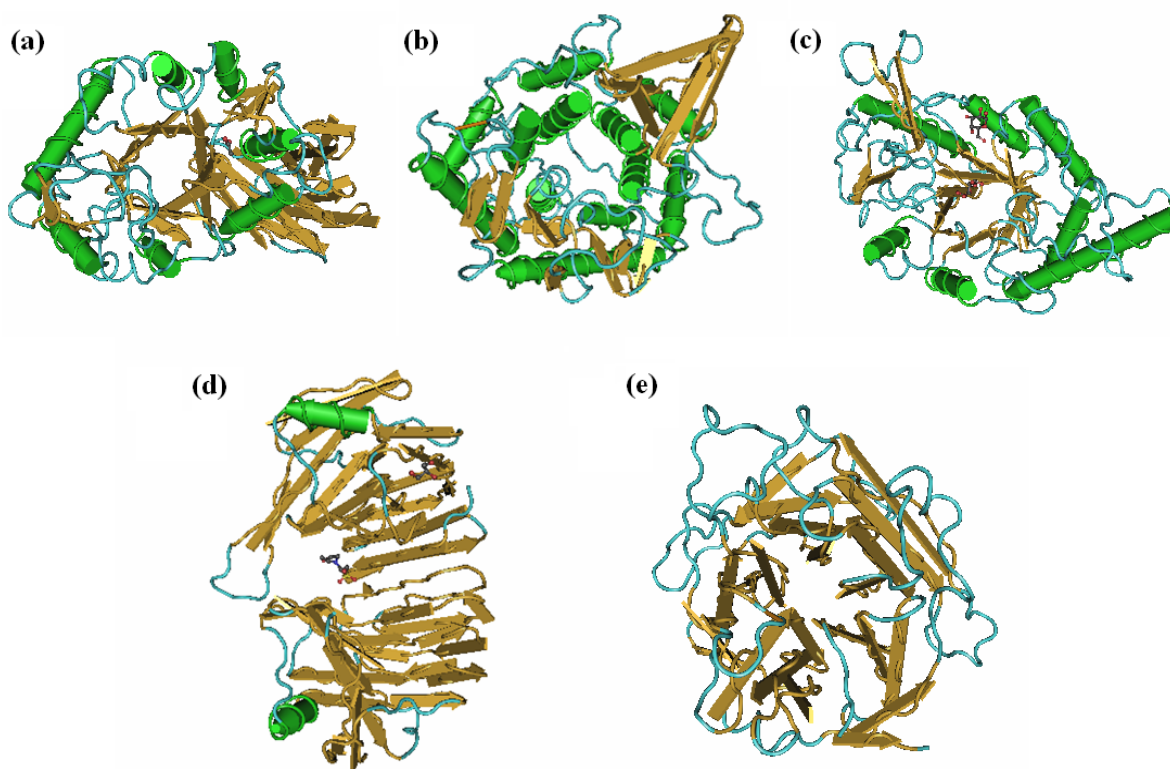
**8 glikozidhidrolazių šeimai** priklausančių ksilanazių yra aprašyta tik kelios. Visos jos pasižymi specifiškumu tik ksilanui. Trimatę šių ksilanazių struktūrą sudaro  $(\alpha/\alpha)_6$  statinė (1.2 pav., (b)). Ši šeima priskiriama GH-M klanui.

**10 glikozidhidrolazių šeimą** sudaro endo-1,4- $\beta$ -ksilanazės (EC 3.2.1.8) ir endo-1,3- $\beta$ -ksilanazės (EC 3.2.1.32). Šie fermentai yra specifiški ne tik ksilanui, bet ir kai kuriems mažos molekulinės masės celiuliozės substratams, pavyzdžiui, aril- $\beta$ -celobiozidams (Ducros ir kt., 2000). Be to, ksilanazės priklausančios šiai šeimai labai efektyviai skaldo trumpus ksilooligosacharidus (Collins ir kt., 2005). Tai rodo, kad jos yra specifiškesnės mažos molekulinės masės substratams. Šios šeimos ksilanazės turi didelę molekulinę masę ir žemą *pI*. Trimatę katalitinio domeno struktūrą sudaro  $(\alpha/\beta)_8$  statinė (1.2 pav., (c)) ir ji priklauso GH-A klanui. Panašią trimatę struktūrą turi 5 šeimos ksilanazės (1.2 pav., (a)).

**11 glikozidhidrolazių šeimai** priklauso ksilanazės (EC 3.2.1.8), kurios yra specifiškos tik D-ksilozę turintiems substratams. Šių fermentų katalitinis aktyvumas yra žemesnis palyginus su 10 šeimos ksilanazėmis. Galutiniai jų hidrolizės produktai yra ksilobiozė ir ksilotriozė, tuo tarpu ksilanazių iš 10 šeimos – ksilozė (Berrin ir Juge, 2008). Be to, 11 šeimos ksilanazės efektyviausiai skaldo ilgas ksilooligosacharidų grandines ir yra specifiškesni didesnės

molekulinės masės substratams nei 10 šeimos atstovai (Berrin ir Juge, 2008). Ksilanazių priklausančių 11 šeimai molekulinė masė yra maža, o *pI* šarminis. Trimatę struktūrą sudaro  $\beta$ -klostės formuojančios dvisluoksnių įduba, kuri apgaubia katalitinį centrą (1.2 pav., (d)). Ši glikozidhidrolazių šeima priklauso GH-C klanui.

**43 glikozidhidrolazių šeimoje** nustatytas tik vienas fermentas pasižymintis ksilanaziniu ir  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaziniu aktyvumais. Šio fermento fizikocheminės ir funkcinės charakteristikos nėra nustatytos. 43 šeimai priklausančių fermentų trimatę struktūrą sudaro „5-fold  $\beta$ -propeller“ (1.2 pav., (e)). Ji priskiriama GH-F klanui.

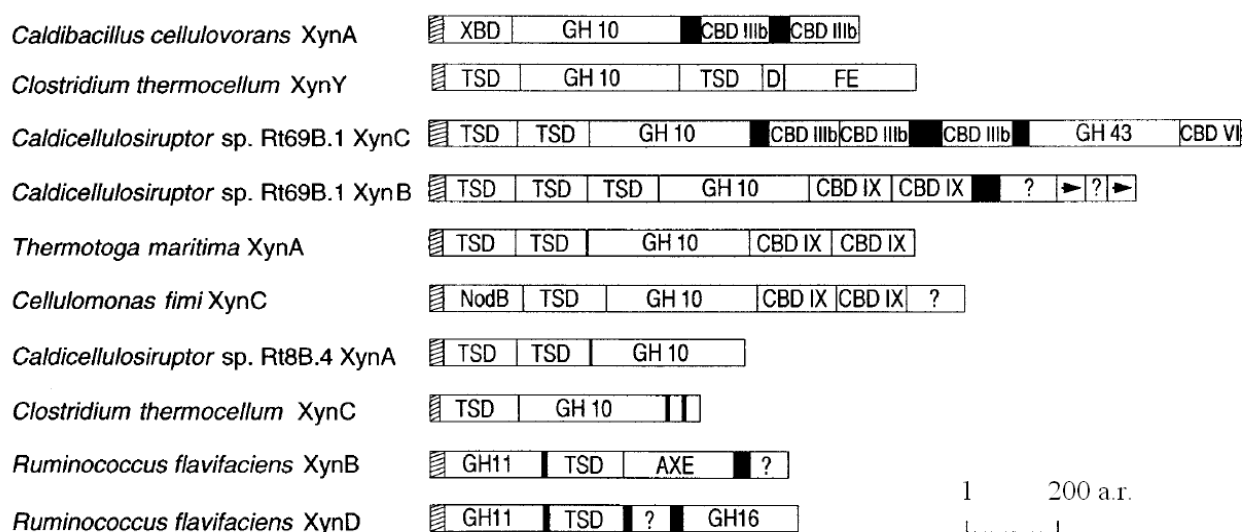


**1.2 pav.** Trimatės ksilanazių struktūros. (a) *Erwinia chrysanthemi* 5 šeimos ksilanazė; (b) *Pseudoalteromonas haloplanktis* 8 šeimos ksilanazė; (c) *Geobacillus stearothermophilus* 10 šeimos ksilanazė; (d) *Bacillus subtilis* 11 šeimos ksilanazė; (e) *Cellvibrio japonicus* 43 šeimos arabinazė (pagal NCBI duomenų bazę).

### 1.3 Ksilanazių struktūra

Prokariotų ksilanazėse dažniausiai sutinkami dviejų tipų domenai: katalitinis ir ksilaną (XBD) arba celiuliozę (CBD) surišantys domenai (1.3 pav.). Dažniausiai šie fermentai turi tik 1 katalitinį domeną. Tačiau, yra parodyta, kad ksilanazės gali jų turėti ir 2. Pavyzdžiui, *Fibrobacter succinogenes* XynC ksilanazę sudaro 2 katalitiniai domenai: A ir B, pasižymintys 1,4- $\beta$ -ksilanaziniu aktyvumu, ir 1 nekatalitinis - C (Zhu ir kt., 1994). Visi 3 domenai sujungti per poliserinines jungtis. A ir B domenų aminorūgščių panašumas sudaro tik 54 % ir jie abu priskiriami 11 glikozidhidrolazių šeimai (Zhu ir kt., 1994). Ksilaną, celiuliozę bei kitus cukrus

surišantys domenai priskiriami angliavandenius surišantiems moduliams (CBMs). Remiantis struktūriniais ir funkciniais panašumais šie baltymų moduliai pagal CAZy duomenų bazę yra grupuojami į šeimas. Pagrindinė tokių modulių funkcija yra padidinti fermento rišimasi prie substrato, kas lemia efektyvesnį jo degradavimą (Berrin ir Juge, 2008). Kai kurios bakterijos sintetina ksilanazes turinčias ne tik aukščiau išvardintus domenus, bet taip pat ir termostabilizuojančius domenus bei dokerinus, dalyvaujančius prisijungime prie multidomeninių kompleksų (1.3 pav.).



**1.3 pav.** Ksilanazių domenų struktūros. XBD, ksilaną surišantis domenas; TSD, termostabilizuojantis domenas; CBD, celiuliozę surišantis domenas; GH10, GH11, GH16, GH43, atitinkamai 10, 11, 16 ir 43 glikozidhidrolazių šeimų domenai; AXE, acetilksilano esterazė; FE, ferulo rūgšties esterazė; D, dokerinas; ?, domenas, kurio funkcija nėra žinoma (Sunna ir kt., 2000).

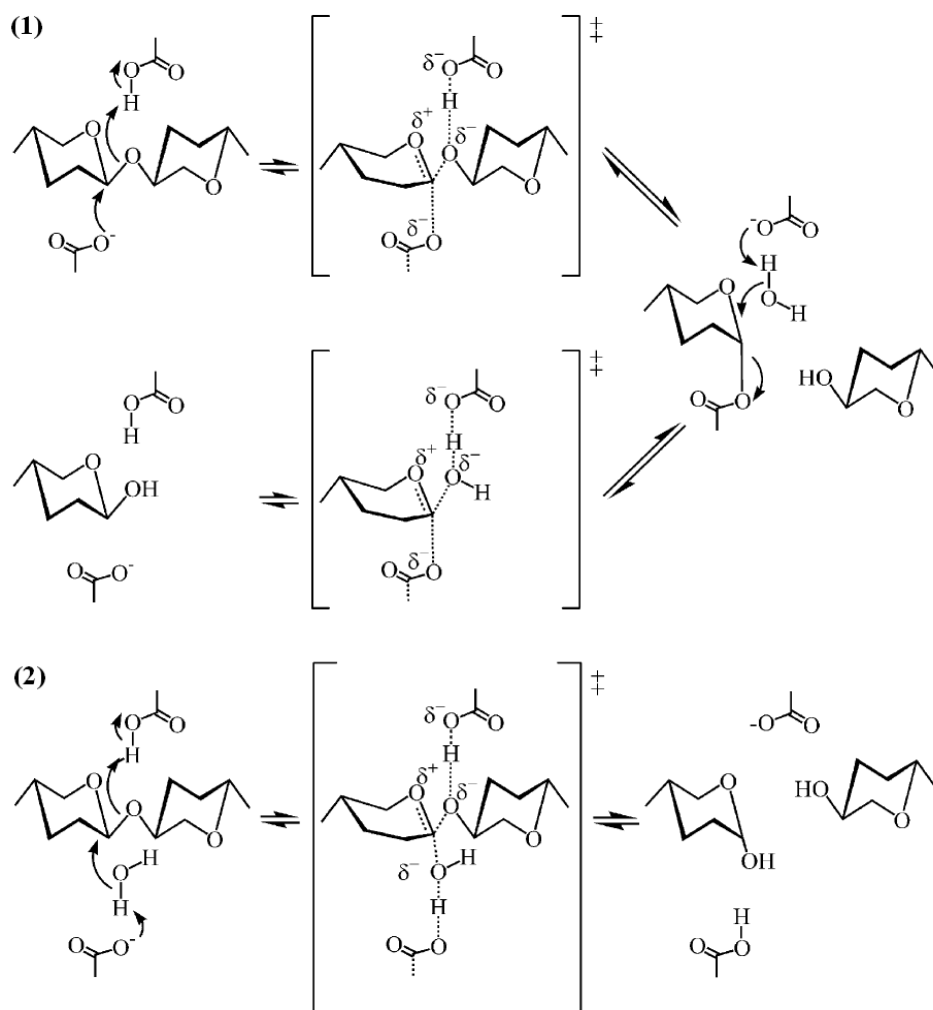
Kadangi ksilanas, kaip jau minėta, yra heterogeniškas polimeras, daugelis mikroorganizmų prisitaikė sintetinti nuo kelių iki keliolikos ksilanazinių fermentų. Tokie fermentai gali turėti skirtingas struktūras bei skirtingus specifinius aktyvumus. Pavyzdžiui, aktinobakterija *Streptomyces thermonitrificans* NTU-88 sekretuoja 19 ksilanolizinių fermentų (Cheng ir kt., 2009). Manoma, kad tokį fermentų skaičių sąlygoja keletas ekspresuojamų genų, potransliacinės modifikacijos ir/arba proteolizė. Kai kurie mikroorganizmai ląstelių paviršiuje turi multifunkcinius fermentų kompleksus vadinamus ksilanosomomis. Tokie kompleksai atlieka svarbų vaidmenį hemiceliuliozės degradacijoje. Pavyzdžiui, *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c ekstraląstelinį ksilanosominį kompleksą sudaro 11 fermentų turinčių ksilanolizinių aktyvumą, bei 3, pasižymintys endogliukanaziniu aktyvumu (Beg ir kt., 2001). Šio komplekso molekulinė masė siekia daugiau nei 669 kDa.

#### 1.4 Ksilanazių biosintezės reguliacija

Dauguma ksilanazių yra sekretuojamos į užląstelinę aplinką, dėl to kad didelės molekulinės masės substratas (ksilanas) negali patekti į mikroorganizmo ląstelę. Šie fermentai gali būti indukuojami arba sintetinami konstitutyviai. Manoma, kad dažniausiai konstitutyviai sintetinami nedideli ksilanazių kiekiai atpalaiduoja ksilooligomerus, kurie toliau yra pernešami į ląstelę (Collins ir kt., 2005). Ląstelėje esančios  $\beta$ -ksilozidazės ir viduląstelinės ksilanazės vykdo tolesnį ksilooligomerų degradavimą. O susidariusios ksilozės molekulės indukuoja ksilanazių sintezę. Taip pat yra aprašyta nemažai ksilanazinių fermentų, kurie gali būti indukuojami ir kitais junginiais: L-sorboze, laktoze, arabinoze, riboze, aviceliu, karboksimetilceliulioze bei lignoceliulioziniais substratais (Dhiman ir kt., 2008). Be to, kai kuriuose *Bacillus*, *Streptomyces* ir *Staphylococcus* genčių kamienuose ksilanazių produktyvumą didina aminorūgščių buvimas terpėje (Beg ir kt., 2001). Tačiau, kai kuriais atvejais, lengvai įsisavinami cukrai, tokie kaip gliukozė, ksilozė ir ribozė, gali veikti kaip ksilanazių sintezės represoriai (Dhiman ir kt., 2008).

#### 1.5 Glikozidhidrolazių katalitinis mechanizmas

Ksilanazės priklauso produkto anomerinę konformaciją išlaikantiems bei invertuojantiems fermentams (1.5 pav.). Glikozidinių ryšių hidrolizė vyksta rūgštinės katalizės būdu, suderintai veikiant dviems aminorūgštims. Produkto anomerinę konformaciją išlaikančių ksilanazių atveju, hidrolizėje dalyvauja 2 glutamato liekanos: viena veikia kaip protonų donoras, o kita – kaip nukleofilas. Ši reakcija vyksta dvigubo pakeitimo mechanizmu (1.5 pav., (1)), o susidaręs produktas yra tokios pačios konformacijos kaip ir substratas (Davies ir Henrissat, 1995). Toks hidrolizės tipas būdingas fermentams priklausantiems 5, 10 ir 11 glikozidhidrolazių šeimoms. Produkto anomerinę konformaciją invertuojančių ksilanazių atveju dalyvauja glutamato ir aspartato liekanos, o hidrolizės reakcija vyksta viengubo pakeitimo mechanizmu (1.5 pav., (2)). Šios reakcijos metu susidariusio produkto konformacija yra priešinga substratui (Davies ir Henrissat, 1995). Toks hidrolizės tipas būdingas 8 ir 43 glikozidhidrolazių šeimoms priskiriamiems fermentams.



**1.5 pav.** Glikozidhidrolazių veikimo mechanizmai. Produkto anomerinės konformacijos (1) išlaikymas ir (2) invertavimas (Collins ir kt., 2005).

## 1.6 Termofilinių bakterijų ksilanazės

Termofilinių bei hipertermofilinių mikroorganizmų sintetamos ksilanazės dažniausiai pasižymi dideliu stabilumu aukštesnėse temperatūrose. Pramoniniu požiūriu ši savybė yra ypač svarbi. Pavyzdžiui, naudojant aukštesnes temperatūras įmanoma išvengti dažnai paplitusių mezofilinių mikroorganizmų užkrato (Haki ir Rakshit, 2003). Aukštesnėse temperatūrose cheminės reakcijos vyksta greičiau, o tai savaime pramoninį procesą daro ekonomiškiau ir pelningesniu.

Termostabilios ksilanazės pagrinde priklauso 10 ir 11 glikozidhidrolazių šeimoms ir yra išskiriamos iš įvairių bakterijų: *Thermotoga* sp., *Rhodothermus marinus*, *Geobacillus* sp., *Clostridium* sp., *Caldibacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Caldicellulosiruptor* sp. ir kitų. Pavyzdžiui, XynA, viena termostabiliausių iki šiol aprašytų endo-1,4- $\beta$ -ksilanazių, kurios optimali temperatūra siekia 105 °C, išskirta iš *Thermotoga* sp. FjSS3-B kamieno (Simpson ir kt., 1991).

Remiantis sekų palyginimais, kristalinės struktūros analize, kryptingos bei atsitiktinės mutagenzės metodais nustatyta, kad mezofilinės ir termofilinės ksilanazės yra labai panašios, o padidintą stabilumą aukštose temperatūrose lemia tik nedidelės modifikacijos (Collins ir kt., 2005). Tokias modifikacijas sąlygoja didesnis vandenilio ryšių ir druskų tiltelių skaičius, termostabilizuojančių domenų tandeminiai pasikartojimai, hidrofobinės ir elektrostatinės sąveikos bei disulfidiniai tilteliai, išsidėstę pagrinde N- arba C- galuose. Yra parodyta, kad pašalinus termostabilizuojantį domeną iš *Clostridium thermocellum* XynX ksilanazės, jos optimali temperatūra sumažėja 5-10 °C (Shin ir kt., 2002). O pavyzdžiui, *Bacillus subtilis* 11 šeimos ksilanazės termostabilumas buvo padidintas pakeitus kelias aminorūgštis kryptingos mutagenzės metodu (Miyazaki ir kt., 2006). To pasekoje padidėjo hidrofobiškumas tarp monomerų, kas lemė didesnę šio baltymo stabilumą aukštose temperatūrose. Be to, nustatyta, kad papildomai įvestas disulfidinis tiltelis padidina XynA ksilanazės iš *Geobacillus stearothermophilus* 236 kamieno termostabilumą 5 °C (Jeong ir kt., 2007). Taip pat yra parodyta, kad *Geobacillus stearothermophilus* XT6 ksilanazėje kryptingos mutagenzės metodu pakeitus 13 aminorūgščių optimali fermento temperatūra padidėjo 10 °C, o katalitinis efektyvumas padidėjo net 90 % (Zhang ir kt., 2010).

### 1.7 *Geobacillus* genties bakterijų ksilanazės

Fermentai pasižymintys endo-1,4- $\beta$ -ksilanaziniu aktyvumu, kurie randami *Geobacillus* gentyje priklauso 10, 11 ir 43 glikozidhidrolazių šeimoms. Visos iki šiol šioje gentyje nustatytos ksilanazės, remiantis aminorūgščių sekų palyginimais, yra gana panašios. Dauguma ksilanazinių fermentų aptikta atlikus *Geobacillus* sp. Y412MC52, *Geobacillus* sp. C56-T3 ir *G. thermodenitrificans* NG80-2 kamienų genomų sekoskaitą. Šiuo metu išskirtos ir aprašytos yra tik *G. stearothermophilus* T-6 (Khasin ir kt., 1993), *Geobacillus* sp. MT-1 (Wu ir kt., 2006), *G. stearothermophilus* 21 (Baba ir kt., 1994), *G. thermoleovorans* (Sharma ir kt., 2007) ir *Geobacillus* spp. (Sabriye ir kt., 2007) kamienų ksilanazės.

Ksilanazės iš *Geobacillus* genties yra panašios ne tik aminorūgščių sekų atžvilgiu, bet ir dažniausiai pasižymi panašiomis savybėmis. *G. stearothermophilus* T-6 ksilanazės optimali veikimo temperatūra yra 65 °C, ir esant šiai temperatūrai baltymas išlieka stabilus daugiau nei 10 valandų. Didžiausias šios ksilanazės aktyvumas nustatytas tarp pH 6,5 ir 7,0. Be to, šis fermentas pasižymi nedideliu endo-1,4- $\beta$ -gliukanaziniu aktyvumu (Khasin ir kt., 1993). *Geobacillus* sp. MT-1 natyvos ir rekombinantinės ksilanazių optimali veikimo temperatūra yra 70 °C. Abi šios ksilanazės, skirtingai nuo *G. stearothermophilus* T-6 ksilanazės, yra stabilios esant 55 ir 60 °C temperatūroms iki trijų valandų (Wu ir kt., 2006). O jų pH optimumas natyvaus baltymo atveju yra 6,5 ir rekombinantinio – 7,0. Apie *Geobacillus* sp. MT-1 ksilanazių substratų specifiskumą

duomenų nėra. *G. thermoleovorans* ksilanazės optimalios veikimo sąlygos, skirtingai nuo aukščiau minėtų, yra pH 8,5 bei 80 °C temperatūra (Sharma ir kt., 2007). Be to, ši ksilanazė nepasižymi celiuliaziniu aktyvumu. Sabriye ir bendraautorai 2007 metais išskyrė iš karštųjų versmių 11 *Geobacillus* sp. kamienų pasižyminčių ksilanaziniu aktyvumu. Septyniuose iš šių kamienų taip pat nustatytas ir arabinofuranozidazinis aktyvumas. Atsižvelgiant į molekulinės baltymų mases, ksilanaziniai fermentai sudarė 3 grupes. Optimalios šių ksilanazių veikimo temperatūros varijavo nuo 65 iki 80 °C, o optimalios pH reikšmės – nuo 7 iki 8.

*Geobacillus* gentyje nustatytos ne tik endo-1,4-β-ksilanazės, bet ir visa eilė fermentų dalyvaujančių ksilano hidrolizėje: β-ksilozidazės (Sharma ir kt., 2007), α-L-arabinofuranozidazės (iš geno sekoskaitos), arabinazės (Takao ir kt., 2002) bei α-D-gliukuronidazės (Zaide ir kt., 2001).

### 1.8 Ksilanazių panaudojimas

Pastaraisiais metais ypač daug dėmesio yra skiriama naujų termostabilių ksilanazių producentų paieškai ir tyrinėjimams dėl plačių šių fermentų praktinio pritaikymo galimybių. Pagrindinė ksilanazių panaudojimo pramonėje sritis yra popieriaus gamyba. Tuo pačiu kartu su kitais fermentais jos yra taikomos maisto pramonėje, pašarų ruošime bei biokonversijoje.

**Popieriaus pramonėje** ksilanazės naudojamos medienos masės balinimo procese. Tamsią medienos masės spalvą sąlygoja lignino buvimas, todėl pagrindinis balinimo etapas yra jo pašalinimas iš medienos masės (Subramaniyan ir Prema, 2002). Kaip jau minėta, hemiceliuliozė atlieka jungiančią funkciją tarp augalų ląstelių sienelių komponentų, ji yra kovalentiškai susirišus su ligninu. Panaudojant ksilanazes medienos masės balinimo etape, hemiceliuliozė yra apardoma, todėl ligninas yra daug lengviau pašalinamas. Be to, tai leidžia sumažinti balinimo procese naudojamo chloro ir susidarančių nuodingų chloro junginių kiekį (Haki ir Rakshit, 2003). Medienos masės apdorojimas ksilanazėmis taip pat pagerina gaminamo popieriaus kokybę – padidina jo tvirtumą. Popieriaus pramonėje naudojamos ksilanazės neturi pasižymėti celiuliaziniu aktyvumu, jos taip pat turi būti stabilios aukštose temperatūrose ir šarminiame pH (Dhiman ir kt., 2008). Yra parodyta, kad sinergetinis ksilanazinių ir pektinolizinių fermentų veikimas pagerina medienos masės balinimo efektyvumą bei sumažina šiame procese naudojamo chloro kiekį 25% (Kaur ir kt., 2010).

Maisto pramonėje ksilanazės yra plačiai taikomos **duonos gaminimo procese**. Grūduose arabinoksilanas yra antras pagal dažnumą polisacharidas (Subramaniyan ir Prema, 2002). Substratų, turinčių sudėtyje arabinoksilaną, apdorojimas ksilanazėmis sumažina jų klampumą ir tuo pagerina jų maistinę vertę (Collins ir kt., 2005). Kartu su kitais fermentais, hidrolizuojančiais augalų ląstelių sienelę, ksilanazės padidina duonos tešlos minkštumą, ji tampa nelimpanti, kas

labai palengvina jos gaminimą (Butt ir kt., 2008). Iš tokios tešlos pagaminta duona ilgesnį laiką išlieka puri ir minkšta, lėčiau sudžiūsta. Ksilanazės kartu su pektinoliniais fermentais taip pat naudojamos **sulčių, nektarų, aliejų bei vynu** nuskaidrinimui (Collins ir kt., 2005).

Dar viena ksilanazių pritaikymo sritis – **pašarų gamyba gyvuliams** (silosas). Veikiant ksilanazėmis augalų sienelės suminkštinamos, kas palengvina augalų masės virškinimą (Khandeparker ir Numan, 2008). Tokiu būdu pašarai tampa maistingesni ir sumažėja kiekis, kurio reikia vienam gyvuliui išmaitinti.

Šiuolaikinė pramonė neatsiejama susijusi su iškastinio kuro naudojimu. Senkant jo ištekliams pradėta intensyvi alternatyvių kuro šaltinių paieška. Augalų masės konversija į biokurą – vienas iš galimų problemos sprendimo būdų. Todėl pastaraisiais metais ypač didelio dėmesio sulaukė ksilanazių pritaikymas **biokuro (etanolio) gamyboje**. Manoma, kad ateityje potencialus biokuro šaltinis galėtų būti daugiametės žolės, pavyzdžiui, *Miscanthus giganteus* arba *Panicum virgatum*, dėl aukšto jų derlingumo ir minimalių reikalavimų auginimui (Heaton ir kt., 2008). Pilnai hidrolizuojant augalų ląstelių sienelių polisacharidus (celiuliozę ir ksilaną) gaunami angliavandeniai, tokie kaip ksilozė, gliukozė ir arabinozė, kurie toliau gali būti fermentuojami iki etilo alkoholio. Pramoninėje etanolio gamyboje naudojamos mielės *Saccharomyces cerevisiae* ir bakterijos *Zymomonas mobilis* nefermentuoja ksilozės ir arabinozės, todėl šiuo metu intensyviai ieškoma natūraliai gamtoje sutinkamų arba genetiškai modifikuotų mikroorganizmų, kurie galėtų fermentuoti monosacharidus iš hemiceliuliozės (Dodd ir Cann, 2009). Ksilanazės dar taikomos ksilano **biokonversijoje iki ksilitolio**, kuris naudojamas kaip naturalus maisto saldiklis (Dhiman ir kt., 2008). Ksilitolis taip pat įeina į dantų pastos sudėtį: veikia kaip antimikrobinis agentas bei stiprina dantis.

Ksilanazės taip pat naudojamos ir **kitose pramonės srityse**: kavos apdorojime ir tirpios kavos gamyboje; detergentų pramonėje; polisacharidų, kurie pasižymi antimikrobinėmis savybėmis prieš gramteigiamąsias bakterijas ir *Helicobacter pylori*, gamyboje; augalų ląstelių protoplastų gavime; riešutų ir vynu aromatizavimo procesuose (Dhiman ir kt., 2008).



## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 MEDŽIAGOS

#### 2.1.1 Reagentai

Applichem, Vokietija	NDS, Tris, EDTA, glicerolis, sacharozė, Kongo raudonasis, kalio natrio tartratas, ZnSO <sub>4</sub> , MnCl <sub>2</sub> , CoCl <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , FeSO <sub>4</sub>
BIO-RAD, JAV	Kumasi mėlynasis R-250, kumasi mėlynasis G-250, akrilamidas, bisakrilamidas
FERAK, Vokietija	Triton X-100
UAB „Fermentas“, Lietuva	<i>Bam</i> HI ir <i>Hind</i> III restrikcijos endonukleazės ir buferiniai tirpalai restrikcijos reakcijoms, Genomic DNA Purification Kit, InsTAclone™ PCR Cloning Kit, CloneJET™ PCR Cloning Kit, DNR fragmentų ilgio standartai: MassRuler™ DNA Ladder Mix, GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, 6× dažas DNR elektroforezei, <i>Taq</i> DNR polimerazė, <i>Pfu</i> DNR polimerazė, baltymų molekulinės masės žymuo: PageRuler™ Unstained Protein Ladder, 50× TAE buferis, IPTG, X-gal
FLUKA, Švedija	Avicelis, karboksimetilceliuliozė, ampicilinas
LONZA, Šveicarija	Agarozė
MACHEREY-NAGEL, Vokietija	NucleoSpin® Extract II DNR fragmentų valymo iš agarozės gelio rinkinys
MERCK, Vokietija	NaOH, triptono sojos agaras, mielių ekstraktas, propanolis, agar-agaras, natrio acetatas, KCl, fosforo rūgštis, HCl, acto rūgštis, APS
OXOID, Anglija	Neutralizuotas bakteriologinis peptonas
REANAL, Vengrija	Bromfenolio mėlis
ROTH, Vokietija	TEMED, amonio sulfatas, metanolis, glicinas, kanamicinas, etidžio bromidas,
SERVA, Vokietija	DMSO
SIGMA, Vokietija	Jaučio serumo albuminas (BSA), ksilanas iš beržo medienos, CaCl <sub>2</sub>
AB „VILNIAUS DEGTINĖ“, Lietuva	Etanolis

## 2.1.2 Bakterijų kamienai

### *Escherichia coli* kamienai

DH5 $\alpha$ : F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrAB*, *thi-1*, *hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>), *supE44*, *relA1*, *deoR*,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169, *phoA*

BL21(DE3): F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), *dcm*, *gal*,  $\lambda$ (DE3)

## 2.1.3 Mitybinės terpės

Termofilinio kamieno auginimui naudota triptono sojos agaras (TSA) terpė, kuri buvo paruošta pagal gamintojo nurodymus. Šio kamieno savybė sekretuoti fermentą, pasižymintį ksilanaziniu aktyvumu, buvo nustatyta naudojant ksilano agarą (Battan ir kt., 2007). *E. coli* kultivuota Luria-Bertani (LB) terpėje, kuri buvo paruošta pagal standartines metodikas (Sambrook ir Russell, 2001).

## 2.1.4 Tirpalai ir buferiai

Plazmidinės DNR skyrimui, valymui ir elektroforetinei analizei naudoti standartiniai tirpalai ir buferiai (Sambrook ir Russell, 2001). NDS-PAGE naudojami buferiai buvo pagaminti pagal Rosenberg, 2005.

## 2.2 METODAI

### 2.2.1 Termofilinių bakterijų skyrimas

Į 250 ml kolbutes išpilstoma po 100 ml distiliuoto vandens, kuriame ištirpinta 0,5 g ksilano ir autoklavuojama. 1 g komposto pavyzdžio steriliai įdedamas į kolbutę ir inkubuojama aeruojant 6 val. esant 60 °C temperatūrai. Daromi skiedimai 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> ir 10<sup>4</sup>, kurie po 100  $\mu$ l špateliavimo būdu išsėjami ant terpės su ksilanu (Battan ir kt., 2007). Inkubuojama 24 val. esant 60 °C temperatūrai. Skirtingos morfologijos bakterijų kolonijos atrenkamos ir išgryninamos klonuojant.

### 2.2.2 Ksilanaziniu aktyvumu pasižyminčių termofilinių bakterijų atranka

Ant terpės su ksilanu kamienai užsėjami brūkšniais ir inkubuojami 24 val. esant 60 °C temperatūrai. Lėkštelės dažomos Kongo raudonojo tirpalu ir plaunamos 1M NaCl tirpalu (Battan ir kt., 2007). Kamienai, gebantys skaidyti ksilaną, suformuoja geltonos spalvos zoną aplink bakterijų biomasę.

### **2.2.3 Ksilanolizinių fermentų produkcija laukiniame JK1 kamiene**

Ksilanolizinių fermentų produkcijai gaminama terpė [g l<sup>-1</sup>: mielių ekstraktas, 3,0; ksilanas, 5,0; NaNO<sub>3</sub>, 3,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5; NaCl, 1,0; pH 7,0], į kurią užsėjama 5 % inokulianto (OT<sub>590</sub> 1,2). JK1 kamienas auginamas 60 °C, 180 rpm, kas 2 val. tikrinant ksilanolizinių aktyvumą šulinėlių metodu.

### **2.2.4 Ksilanolizinio aktyvumo nustatymas šulinėlių metodu**

Petri lėkštelėje paruošiamas agarizuotas substratas [g l<sup>-1</sup>: ksilanas, 5,0; agar-agaras, 15,0]. Į šulinėlius įnešama po 100 μl supernatanto iš terpės naudojamos ksilanolizinių fermentų produkcijai (žiūrėti 2.2.20 skyrelį). Inkubuojama 60 °C, 24 val. Lėkštelės dažomos 0,3 % Kongo raudonojo tirpalu ir plaunamos 1M NaCl tirpalu. Geltonos spalvos zonų susidarymas aplink šulinėlius rodo ksilanolizinių aktyvumą.

### **2.2.5 Baltymų nusodinimas amonio sulfatu**

Po 10 val. JK1 kamieno kultivavimo ląstelės nusodinamos, centrifuguojant 4 °C, 15 min, 7000×g greičiu. Supernatantas nupilamas ir vykdomi 40 % ir 60 % (amonio sulfato įsotinimo laipsniai) baltymų frakcionavimai, maišant tirpalą magnetine maišykle per naktį esant 4 °C temperatūrai. Centrifuguojama 4 °C, 20 min, 12000×g greičiu. Nuosodinti baltymai ištirpinami Tris-HCl buferyje, pH 7,0. Toliau vykdoma dializė.

### **2.2.6 Bakterijų genominės DNR skyrimas**

Genominė DNR skirta naudojant Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Lietuva) rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas.

### **2.2.7 Ksilanazių genų paieška PGR metodu**

Ksilanazių genų paieškai PGR metodu buvo naudoti ksilanzėms specifiniai pradmenys (GeXylF 5'-ATG CCC CAC AAT TGG ATC AAC-3' ir GeXylR 5'-GGC GCA TCT TTT CCT TTC CTT-3').

PGR reakcijos sąlygos: pradinė denatūracija 95 °C / 2 min; denatūracija 95 °C / 1 min, lydymas 60 °C / 2 min, elongacija 72 °C / 3 min; galutinė elongacija 72 °C / 7 min.

### **2.2.8 PGR produkto sekoskaita**

PGR produkto (visų šiame darbe išvardintų) sekoskaita buvo atlikta Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centre naudojant BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit rinkinį (Applied Biosystems, JAV).

### **2.2.9 16S rDNR amplifikavimas**

PGR reakcijoms naudoti universalūs pradmenys (27F 5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3' ir 1495R 5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3'), skirti bakterijų 16S rDNR amplifikavimui (Studholme ir kt., 1999).

PGR reakcijos sąlygos: pradinė denatūracija 95 °C / 2 min; denatūracija 95 °C / 1 min, lydymas 50 °C / 2 min, elongacija 72 °C / 3 min (31 ciklas); galutinė elongacija 72 °C / 7 min.

16S rDNR PGR reakcijos produktų elektroforetinė analizė 1 % agarozės gelyje atlikta pagal standartines metodikas (Sambrook ir Russell, 2001).

### **2.2.10 16S rDNR PGR produkto valymas**

16S rDNR produkto valymui iš agarozinio gelio naudotas NucleoSpin® Extract II Kit (MACHEREY-NAGEL, Vokietija). Valymas atliktas pagal gamintojo rekomendacijas.

### **2.2.11 16S rDNR klonavimas**

16S rDNR PGR produktas klonuotas į pTZ57R/T klonavimo vektorių, naudojant InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Lietuva). Klonavimas atliktas pagal gamintojo rekomendacijas.

### **2.2.12 Plazmidinės DNR skyrimas**

Plazmidinė DNR iš *E. coli* su įklonuotų 16S rRNR genu buvo skirta standartiniu šarminės lizės metodu (Sambrook ir Russell, 2001).

### **2.2.13 16S rDNR sekų kompiuterinė analizė**

Tiriamo kamieno 16S rDNR sekvenavimo rezultatai apdoroti naudojantis *DNASar Lasergene v7.1.0* programiniu paketu. Seka buvo palyginta su NCBI duomenų bazėje esančiomis sekomis naudojant *MEGA 4* programinį paketą (Tamura ir kt., 2007).

### 2.2.14 Filogenetinė analizė

Filogenetinei analizei naudotos *Geobacillus* genties bakterijų tipinių kamienų 16S rDNR sekos iš NCBI duomenų bazės. Sekų analizė, atstumo matricų pagal Jukes – Cantor modelį apskaičiavimas ir filogenetinio medžio braižymas artimiausių grupių sujungimo metodu atlikti naudojantis *MEGA 4* programiniu paketu (Tamura ir kt., 2007). Filogenetinio medžio atskaitos tašku pasirinktas *Bacillus subtilis* tipinis kamienas.

### 2.2.15 *spo0A* geno amplifikavimas ir filogenetinė analizė

*spo0A* geno amplifikavimas atliktas pagal Kuisienę ir kt., 2009. Tiriamo kamieno *spo0A* sekvenavimo rezultatai apdoroti naudojantis *DNASar Lasergene v7.1.0* programiniu paketu. Filogenetinei analizei naudotos tipinių bakterijų kamienų *spo0A* genų sekos (pagal Kuisienę ir kt., 2009). Filogenetinio medžio braižymas artimiausių grupių sujungimo metodu atlikti naudojantis *MEGA 4* programiniu paketu (Tamura ir kt., 2007). Filogenetinio medžio atskaitos tašku pasirinktas *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 kamienas.

### 2.2.16 Elektrokompentinių *E. coli* ląstelių paruošimas

Elektrokompentinės *E. coli* DH5 $\alpha$  ir BL21(DE3) ląstelės paruoštos ir transformuotos elektroporacijos būdu (Sambrook ir Russell, 2001).

### 2.2.17 Ksilanazės geno amplifikavimas

Ksilanazės geno amplifikavimui buvo naudoti specifiniai pradmenys: JulXylF 5'-GGT CG | G ATC CCC CAT GTT GAA AAG ATC G-3' ir JulXylR 5'-G GGG A | AG CTT TCA CTT ATG ATC GAT AAT-3', turintys unikalias restriktazių kirpimo vietas (pabraukta).

PGR reakcijai naudota *Pfu* polimerazė.

PGR reakcijos sąlygos: pradinė denatūracija 95 °C / 2 min; denatūracija 95 °C / 1 min, lydymas 60 °C / 2 min, elongacija 72 °C / 3 min; galutinė elongacija 72 °C / 7 min.

### 2.2.18 Ksilanazės geno klonavimas į pJET1.2/blunt klonavimo vektorių

Ksilanazės geno PGR produktas klonuotas į pJET1.2/blunt klonavimo vektorių, naudojant CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Lietuva). Klonavimas atliktas pagal gamintojo rekomendacijas. Klonavimui naudotos elektrokompentinės *E. coli* DH5 $\alpha$  ląstelės.

### **2.2.19 Ksilanazės geno iškirpimas**

Ksilanazės geno iškirpimui iš pJET1.2/blunt vektoriaus naudotos *Bam*HI ir *Hind*III endonukleazės pagal gamintojo rekomendacijas (Fermentas, Lietuva).

### **2.2.20 Ksilanazės geno klonavimas į pET-28c(+) ekspresijos vektorių**

pET-28c(+) ekspresijos vektorius sukerpamas *Bam*HI ir *Hind*III restrikejos endonukleazėmis ir liguojamas su iškirptu ksilanazės genu. Klonavimas atliktas pagal gamintojo rekomendacijas (Novagen, Vokietija). Klonavimui naudotos elektrokompetentinės *E. coli* BL21(DE3) ląstelės.

### **2.2.21 Rekombinantinės ksilanazės ekspresijos optimizavimas**

Rekombinantinės ksilanazės ekspresijos optimizavimas *E. coli* BL21(DE3) ląstelėse atliktas keičiant *E. coli* BL21(DE3) auginimo temperatūrą (25, 30, 37 °C), naudojant skirtingą IPTG koncentraciją (0,1; 0,5 ir 1,0 mM) bei skirtingą indukcijos laiką (4-12 val. intervale).

### **2.2.22 *E. coli* ląstelių suardymas ultragarsu**

Baltymų skyrimui iš *E. coli* BL21(DE3) ląstelių naudotas Sonics Vibra-cell dizintegratorius. Po dezintegravimo, ląstelių nuolaužos pašalinamos centrifuguojant 20 min, 10000 x g.

### **2.2.23 Rekombinantinės ksilanazės gryninimas**

Rekombinantinio baltymo gryninimas atliktas afininės chromatografijos metodu naudojant nikelio dervos kolonėles His-Spin Protein Miniprep™ (Zymo Research, JAV) pagal gamintojo nurodymus.

### **2.2.24 Baltymų dializė**

Dializės membrana (Spectra/Por® Biotech RC, pralaidumas iki 10 kDa) sudrėkinama buferyje, kuriame dializuojami baltymai. Rekombinantinės ksilanazės atveju naudojamas 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 buferis, o baltymų iš JK1 kamieno atveju – 50 mM Tris-HCl, pH 7,0. Dializė vykdoma 4 °C, 14 val. Naudojant magnetinę maišyklę ir porą kartų pakeičiant buferį. Po dializės baltymai surenkami ir nustatoma jų koncentracija.

### **2.2.25 Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu**

Bradfordo reagento gaminimas ir baltymų koncentracijos nustatymas atliekami pagal standartines metodikas (Rosenberg, 2005).

### **2.2.26 NDS-PAGE analizė**

Rekombinantinės ksilanazės ekspresijos bei baltymų iš JK1 kamieno elektroforetinė analizė 12 % poliakrilamido gelyje atlikta pagal standartines metodikas (Rosenberg, 2005). Baltymų molekulinės masės nustatymui naudojamas žymuo PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas, Lietuva).

### **2.2.27 Zimogramos analizė**

Zimogramai gauti į skiriamąjį gelį dedama 0,15 % ksilano. Po elektroforezės gelis praplaunamas 2 kartus (po 20 min) 100 mM pH 6,0 acetatiniame buferyje su 1 % Triton X-100 ir inkubuojamas tokia pačia buferyje 1 val. 20 min, esant 60 °C temperatūrai. Po inkubavimo gelis dažomas 0,3 % Kongo raudonojo tirpalu 20 min ir blukinamas 1M NaCl, kol atsiranda šviesios zonos.

### **2.2.28 Fermentinio aktyvumo nustatymas DNS metodu**

Ksilanazinis aktyvumas nustatomas matuojant redukuojančių cukrų kiekį, kuris susidaro ksilano hidrolizės metu (Miller, 1959). Reakcijos mišinį sudaro vienodi tūriai atitinkamai praskiesto fermentinio tirpalo ir 100mM Tris-HCl, pH 7,0 buferio, kuriame ištirpinta 0,5 % ksilano. Kalibracinės kreivės gavimui naudojama D-ksilozė.

### **2.2.29 pH įtaka ksilanaziniam aktyvumui**

pH įtaka ksilanaziniam aktyvumui nustatoma pH 4-10 ribose, naudojant tris skirtingus buferius (100 mM): acetatinį (pH 4-6), Tris-HCl (pH 7-8) ir glicininį-NaOH (pH 9-10). Fermentinės reakcijos mišiniai laikomi 30 min esant 60 °C temperatūrai. Aktyvumas nustatomas pagal 2.2.28 skyrelyje nurodytas sąlygas.

### **2.2.30 Temperatūros įtaka ksilanaziniam aktyvumui**

Temperatūros įtaka ksilanaziniam aktyvumui nustatoma inkubuojant fermentinės reakcijos mišinius esant skirtingoms temperatūroms: 50, 55, 60, 65, 70, 75 ir 80 °C, 100 mM

acetatiniame buferyje (pH 6,0), 30 min. Aktyvumas nustatomas pagal 2.2.28 skyrelyje nurodytas sąlygas.

### **2.2.31 Metalų jonų įtaka ksilanaziniam aktyvumui**

Metalų jonų įtaka ksilanaziniam aktyvumui nustatoma inkubuoiant fermentą su skirtingais metalų jonais (1 mM): Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, 100 mM acetatiniame buferyje (pH 6,0), esant 70 °C temperatūrai, 30 min. Aktyvumas nustatomas pagal 2.2.28 skyrelyje nurodytas sąlygas.

### **2.2.32 Substrato specifiškumo nustatymas**

Rekombinantinės ksilanazės substrato specifiškumas nustatomas inkubuoiant fermentą su skirtingais substratais (0,5 %): ksilanas, karboksimetilceliuliozė, avicelis, 100 mM Tris-HCl buferyje (pH 7,0), esant 60 °C temperatūrai, 30 min. Aktyvumas nustatomas pagal 2.2.28 skyrelyje nurodytas sąlygas.

### **2.2.33 Rekombinantinės ksilanazės termostabilumo nustatymas**

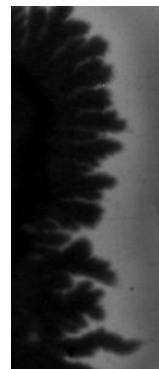
Rekombinantinio baltymo termostabilumas nustatomas preinkubuoiant fermentą 5, 15, 30, 45 bei 60 min esant skirtingoms temperatūroms: 55, 60, 65, 70 °C. Toliau fermentas inkubuojamas kartu su 0,5 % substrato (ksilano), 100 mM acetatiniame buferyje, 10 min, atitinkamai esant 55, 60, 65 ir 70 °C temperatūroms. Aktyvumas nustatomas pagal 2.2.28 skyrelyje nurodytas sąlygas.



### 3. REZULTATAI

#### 3.1 Termofilinių bakterijų, pasižyminčių ksilanaziniu aktyvumu, paieška ir atranka

Iš komposto pavyzdžių buvo išskirti 37 termofiliniai, ksilanaziniu aktyvumu pasižymintys kamienai. Iš šių kamienų buvo atrinktas vienas (JK1), kuris aktyviausiai iš visų skaidė ksilaną, suformuodamas šviesios spalvos zoną aplink bakterijų biomasę (3.1 pav.). Tai rodo, kad JK1 kamienas turi sekretuojamus į užląstelinę aplinką ksilanolizinius fermentus.



3.1 pav. JK1 augimas ant ksilano terpės.

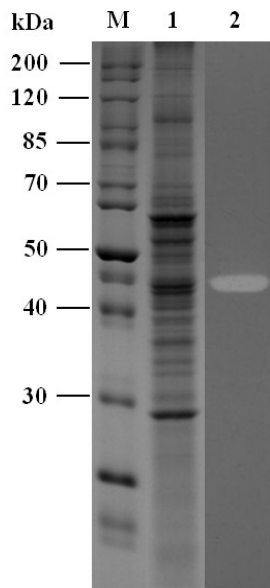
#### 3.2 Ksilanolizinių fermentų sintezė JK1 kamiene

Ksilanolizinių fermentų sintezė buvo įvertinta naudojant šulinėlių metodą. Nustatyta, kad ksilaną skaidantys fermentai sekretuojami į terpę po 4 val. JK1 kamieno kultivavimo. Didžiausios zonos susidariusios aplink šulinėlius pastebėtos po 10 val. bakterijų kultivavimo terpėje su ksilanu, kas rodo, jog po 10 val. augimo JK1 kamieno sekretuojami ksilanoliziniai fermentai terpėje pasiekia didžiausią koncentraciją..

#### 3.3 Baltymų skyrimas iš JK1 kamieno

Atsižvelgiant į sekretuojamų ksilanolizinių fermentų kiekį bakterijų kultivavimo metu, baltymus iš terpės pasirinkta skirti po 10 val. JK1 kamieno augimo terpėje su ksilanu. Po baltymų nusodinimo naudojant 40 % ir 60 % amonio sulfato įsotinimo laipsnius atlikta dializė ir įvertintas ksilanolizinis aktyvumas šulinėlių metodu. Nustatyta, kad ksilanoliziniu aktyvumu pasižymėjo tik tie baltymai, kurie buvo išsodinti naudojant 60 % amonio sulfato įsotinimo laipsnį. Todėl tolimesni eksperimentai vykdomi su šiais baltymais.

### 3.4 JK1 kamieno ksilanolizinių fermentų zimograma



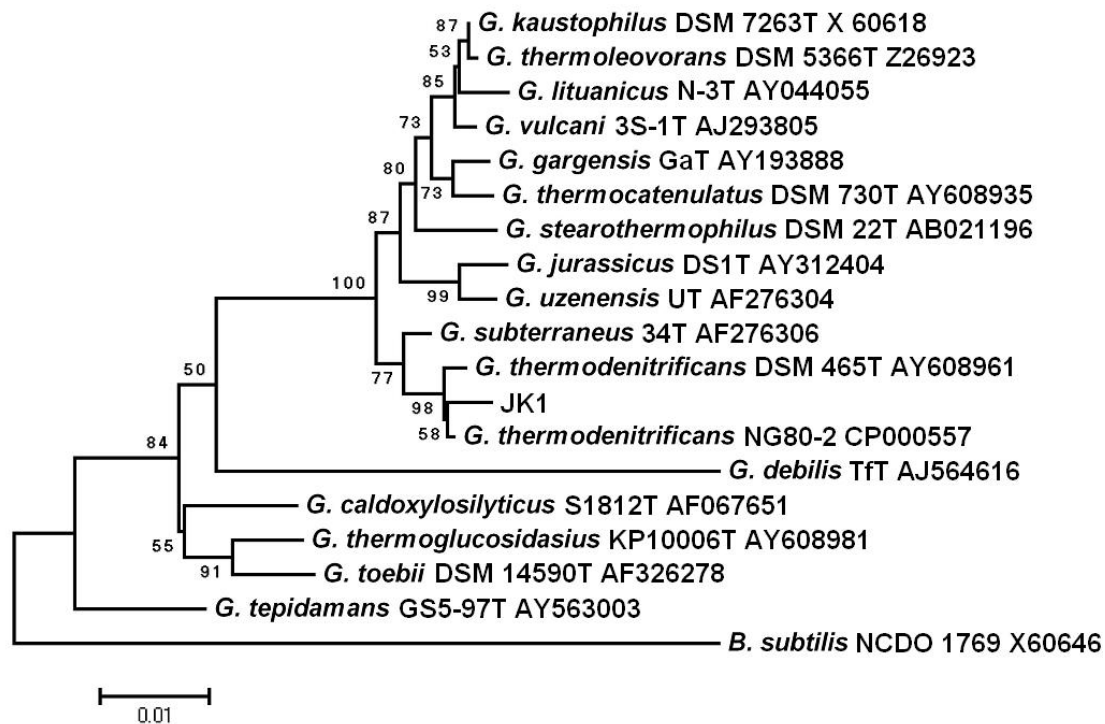
**3.4 pav.** JK1 kamieno baltymų NDS-PAGE ir zimograma. Žymėjimas: M – molekulinės masės žymuo; 1, 2 – baltymai iš JK1 kamieno.

Siekiant nustatyti, kiek ksilanolizinių fermentų JK1 kamienas sekretuoja bei kokia jų molekulinė masė, atlikta tiriamo kamieno baltymų zimograma (3.4 pav.). Zimogramos gavimui, į darbinį poliakrilamido gelį papildomai dedama 0,15 % ksilano. Dalis gelio dažoma Kongo raudonojo dažais, tokiu būdu nustatant ksilanolizinių fermentų lokalizaciją gelyje. Molekulinės masės nustatymui, kita dalis gelio dažoma Kumasi mėlynojo dažais.

Zimogramoje matosi viena diskretiška zona (3.4 pav.), tai reiškia, kad JK1 kamienas sekretuoja į terpę vieną fermentą, pasižyminti ksilanoliziniu aktyvumu. Šio baltymo apytikslė molekulinė masė – 45kDa.

### 3.5 16S rRNR geno sekų palyginimas ir filogenetinis medis

JK1 kamieno 16S rRNR geno seka buvo palyginta su NCBI duomenų bazėje esančiomis sekomis (BLAST programa), siekiant nustatyti kokios prokariotų sistematinei grupei tiriamas kamienas yra artimiausias. Rezultatai parodė, kad JK1 kamienas yra artimiausias *Geobacillus* genčiai. Todėl tiriamo kamieno 16S rRNR geno seka buvo palyginta su *Geobacillus* genties bakterijų tipinių kamienų 16S rRNR genų sekomis, kurios buvo gautos iš NCBI duomenų bazės. Šie duomenys (1388 bp ilgio sekos) buvo panaudoti filogenetinio medžio braižymui artimiausių grupių apjungimo metodu, pagal 1000 medžių statistinio patikimumo analizę (3.6 pav.). Visos pozicijos, turinčios tarpus ir neidentifikuotus nukleotidus buvo eliminuotos. Sekų palyginimui ir filogenetinio medžio braižymui naudotas *MEGA 4* programinis paketas (Tamura ir kt., 2007).

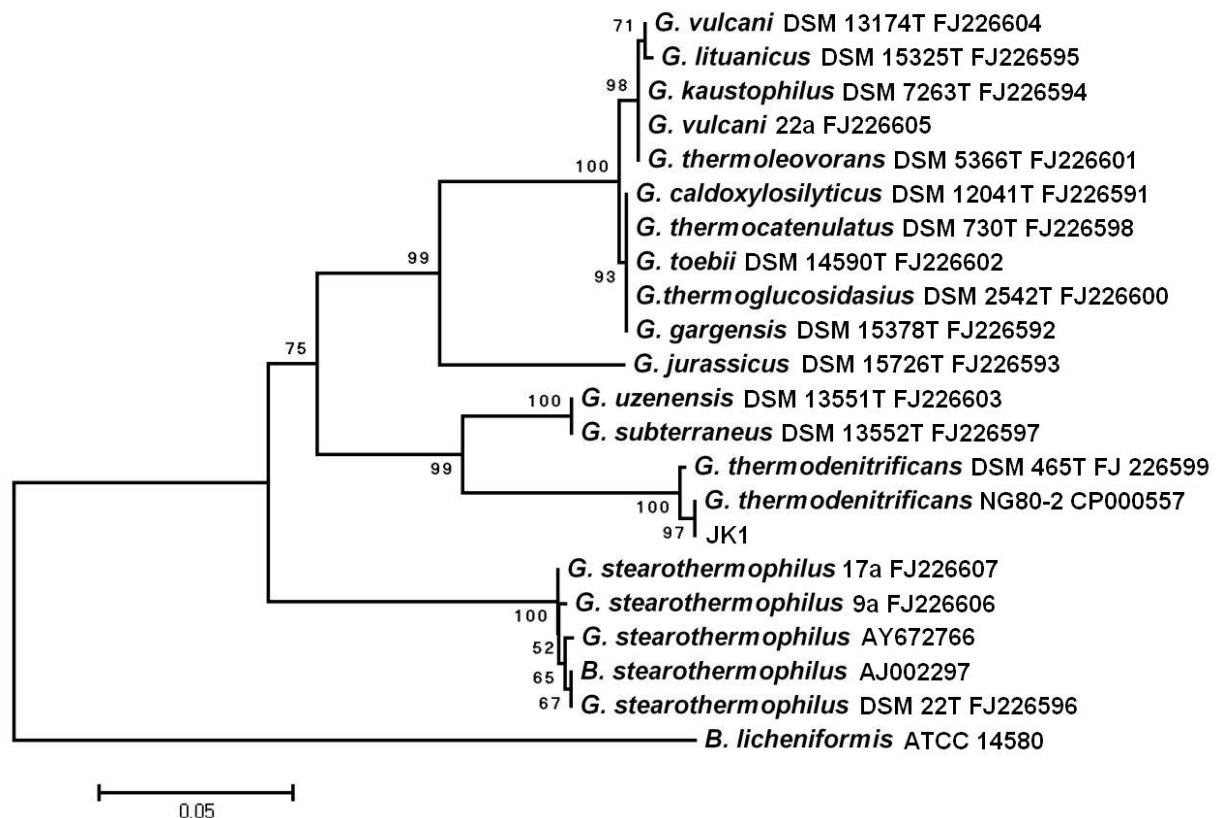


**3.6 pav.** JK1 ir tipinių *Geobacillus* genties kamienų 16S rDNR sekų filogenetinis medis. Brūkšnys – 0,01 nukleotido pasikeitimų vienoje padėtyje. Žymėjimas: *G.* – *Geobacillus*; *B.* – *Bacillus*.

Analizuojant filogenetinį medį (3.6 pav.) matosi, kad tiriamas kamienas artimiausias *G. thermodenitrificans* NG80-2 kamienui.

### 3.6 *spo0A* geno sekų palyginimas ir filogenetinė analizė

JK1 kamieno *spo0A* geno seka buvo palyginta su su NCBI duomenų bazėje esančiomis sekomis (BLAST programa). Rezultatai parodė, kad tiriamas kamienas yra artimiausias *Geobacillus* genčiai. Todėl tiriamo kamieno *spo0A* geno seka buvo palyginta su *Geobacillus* genties bakterijų kamienų *spo0A* genų sekomis, kurios buvo gautos iš NCBI duomenų bazės. Panaudojant šiuos duomenis buvo nubraižytas filogenetinis medis (3.7 pav.). Sekų palyginimui ir filogenetinio medžio braižymui naudotas *MEGA 4* programinis paketas (Tamura ir kt., 2007).



**3.7 pav.** JK1 ir tipinių *Geobacillus* genties kamienų *spo0A* geno sekų filogenetinis medis. Brūkšny – 0,02 nukleotido pasikeitimų vienoje padėtyje. Žymėjimas: *G.* – *Geobacillus*; *B.* – *Bacillus*.

Analizuojant filogenetinį medį (3.7 pav.), nustatyta kad tiriamas kamienas artimiausias *G. thermodenitrificans* NG80-2 kamienui.

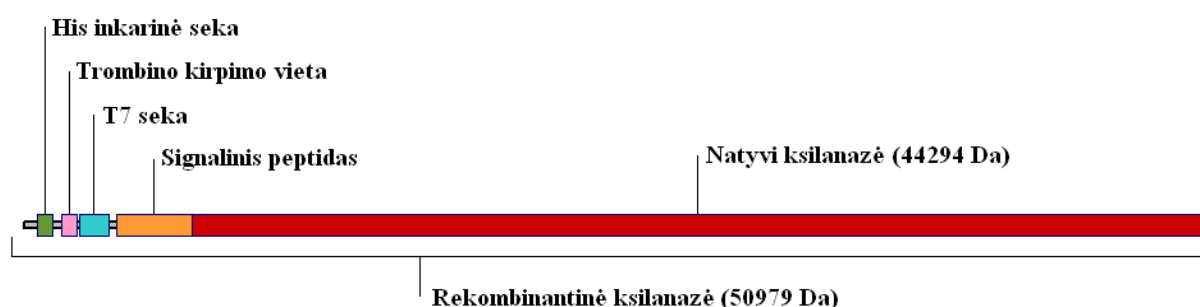
### 3.7 Ksilanazės geno paieška

Ksilanazių genų paieškai naudoti pradmenys buvo sukonstruoti pagal *G. stearothermophilus* T-6 ir *G. thermodenitrificans* T-2 kamienuose randamų ksilanazių genų konservatyvias sekas. Naudojant šiuos specifinius pradmenis buvo amplifikuotas nepilnas ksilanazės genas.

### 3.8 Ksilanazės geno klonavimas ir rekombinantinės ksilanazės konstravimas

16S rRNR ir *spo0A* genų filogenetinės analizės parodė, kad tiriamas kamienas yra artimiausias *G. thermodenitrificans* NG80-2 kamienui, kuriuo genomas yra sekvenuotas, jame nustatytas ksilanazės genas. Todėl, pagal šią žinomą geno seką buvo sukonstruoti pradmenys, kurių pagalba amplifikuotas ksilanazės genas (1224 bp) esantis JK1 kamiene. Į šiuos pradmenis papildomai buvo įvesti restrikcijos endonukleazių (*Bam*HI ir *Hind*III) kirpimo taikiniai, reikalingi ksilanazės geno išuovimui į ekspresijos vektorių.

pET-28c(+) ekspresijos vektorius įgalina ne tik efektyviai ekspresuoti tikslinį baltymą, bet ir gauti rekombinantinius baltymus sulietus su N gale lokalizuota His inkarine seka. JK1 kamieno ksilanazė amplifikuota naudojant geno galams specifinius pradmenis su įterptais endonukleazių taikiniaus PGR metodu. PGR produktas klonuotas į pJET1.2/blunt klonavimo vektorių ir sekvenuotas. Vėlesnių eksperimentų metu ksilanazės genas iškirptas iš pJET1.2/blunt ir perkeltas į pET-28c(+) ekspresijos vektorių sukonstruojant rekombinantinę ksilanazę su His inkarine seka (3.8.1 pav.). Tai leido naudoti nikelio afininės chromatografijos metodą gryninant fermentą.



**3.8.1 pav.** Rekombinantinės ksilanazės grafinė schema..

Sukonstruotos rekombinantinės ksilanazės aminorūgščių seka (3.8.2 pav.) analizuota *Lasergene v7.1.0* ir *MEGA 4* programiniais paketais bei PROSITE (<http://expasy.org/prosite/>) ir SIG-Pred ([http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot\\_analysis/Signal.html](http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html)) internetinėmis programomis. Nustatyta, kad šio baltymo molekulinė masė 50,979 kDa. Kadangi JK1 kamienas sekretavo ksilanazę į užląstelinę aplinką, naudojant SIG-Pred programą buvo nustatyta, kad šis fermentas turi 28 aminorūgščių ilgio sekrecijos signalinį peptidą. Rekombinantinio baltymo domeninės organizacijos nustatymui naudota PROSITE programa. Programos rezultatai parodė, kad ksilanazė turi 10 glikozidhidrolazių šeimos katalitinį centrą (3.8.2 pav.). Taip pat buvo nustatyta, kad fermentas neturi jokių papildomų domenų, tik katalitinį.

```

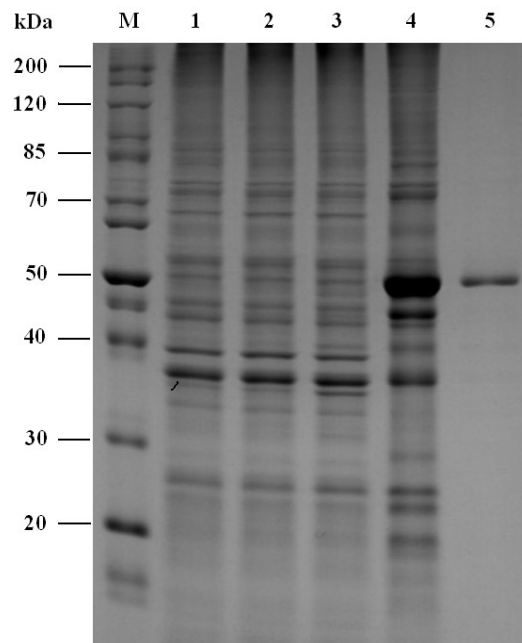
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRI PMLKRSRKAI IVGFSFMLLLPLGMTNALAKTEQS
YAKKPQISALHAPQLDQRYKDSFTIGAAVEPYQLLNEKDAQMLKRHFNSIVAENVMPINIQPEEGK
FNFAEADQIVRFQKHHMDIRFHTLVWHSQVPQWFFLDKEGQPMVNETDPVKREQNKQLLLKRIETH
IKTIVEREKDDIKYWDVVNEVVGDDGELRDSWPYQIAGIDYIKVAFQTARKYGGNKIKLYINDYNTE
VEPKRSALYNLVKQLKEEGIPIDGIGHQSHIQIDWPSEEEIEKTIIMFADLGLDNQITELDVSMYGW
PPRAYLSYDAIPEQKFLDQADRYDRLFKLYEKLSDKISNVTFWGIADNHTWLDSDRADVYYDADGNVI
VDPKAPYTRVEKNGKDAFPVFDPEYNVKPAYWAIIDHK

```

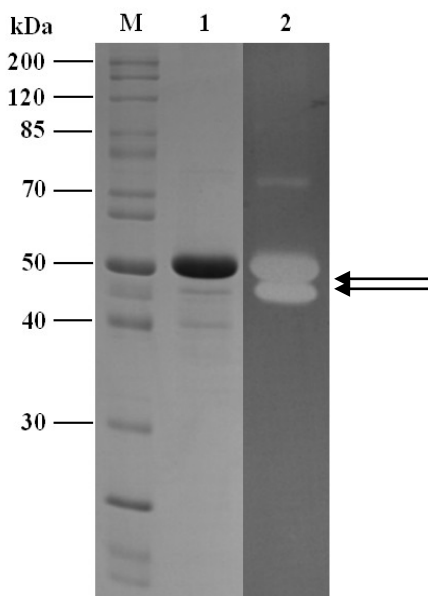
**3.8.2 pav.** Rekombinantinės ksilanazės seka (441 aminorūgštis). 28 aminorūgščių signalinis peptidas *pabrauktas*. GH10 šeimos katalitinis domenai parodytas *tamsiame fone*.

### 3.9 Rekombinantinės ksilanazės ekspresija ir gryninimas

Rekombinantinės ksilanazės ekspresija *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėse optimizuota keičiant *E. coli* BL21(DE3) auginimo temperatūrą (25, 30, 37 °C), naudojant skirtingą indukcijos laiką (4-12 val. intervale), skirtingą IPTG koncentraciją (0,1; 0,5 ir 1,0 mM) bei skirtingą ląstelių tankį (OT<sub>590</sub> 0,5; 0,8 ir 1,0). Nustatytos optimalios ekspresijos sąlygos buvo: 5 val. indukcija esant 30 °C temperatūrai su 0,5 mM IPTG, naudojant OT<sub>590</sub> 0,8 tankio kultūrą. Po indukcijos ląstelės nucentrifuguotos, praplautos PBS buferiu bei suspenduotos tame pačiame buferyje. Ląstelės suardytos ultragarsu. O baltymai analizuoti NDS-PAGE (3.9.1 pav.).



**3.9.1 pav.** Rekombinantinės ksilanazės NDS-PAGE analizė. Žymėjimas: M – molekulinės masės žymuo; 1 – baltymai iš *E. coli* BL21 (DE3); 2 – baltymai iš *E. coli* BL21 (DE3) su tuščiu pET-28c(+); 3 - baltymai iš *E. coli* BL21 (DE3) su pET-28c(+) ir rekombinantine ksilanaze (neinduokuota); 4 - tas pats, kas 3, išskyrus tai, kad rek. ksilanazė indukuota; 5 – gryninta rek. ksilanazė.



**3.9.2 pav.** Rekombinantinės ksilanazės zimograma. Žymėjimas: M – molekulinės masės žymuo (PageRuler™ Unstained Protein Ladder); 1, 2 – grynintas baltymas.

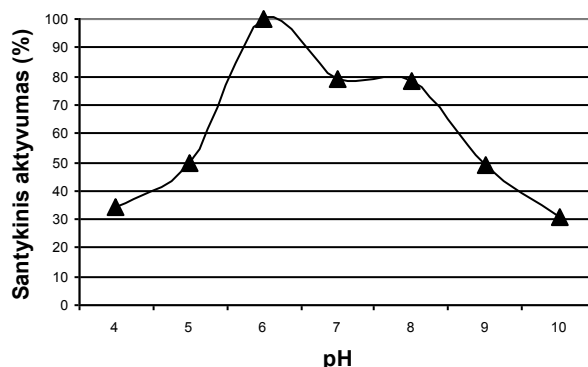
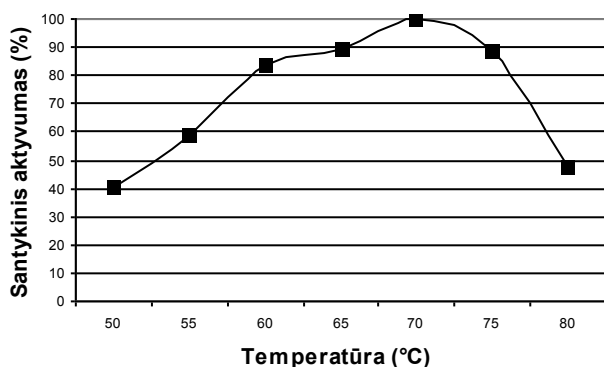
Rekombinantinės ksilanazės gryninimas atliktas esant 4 °C temperatūrai, naudojant nikelio afininės chromatografijos metodą. Grynintas baltymas analizuotas NDS-PAGE (3.9.1 pav.) bei atlikta jo zimograma (3.9.2 pav.). Zimogramoje (3.9.2 pav, 2 takelis) matosi 2 diskretiškos zonos (pažymėta rodyklėmis). Zona, išsidėsčiusi ties 51 kDa, atitinka rekombinantinės ksilanazės dydį su signaliniu peptidu ir N gale esančiomis papildomomis sekomis (3.8.1 pav.). Kita zona, esanti ties 44 kDa, atitinka natyvų baltymą be sekrecijos metu pašalintos signalinio peptido sekos (3.8.1 pav.).

Labiausiai tikėtina, kad dalis fermento buvo sekretuojama į periplazminę ertmę nukerpant

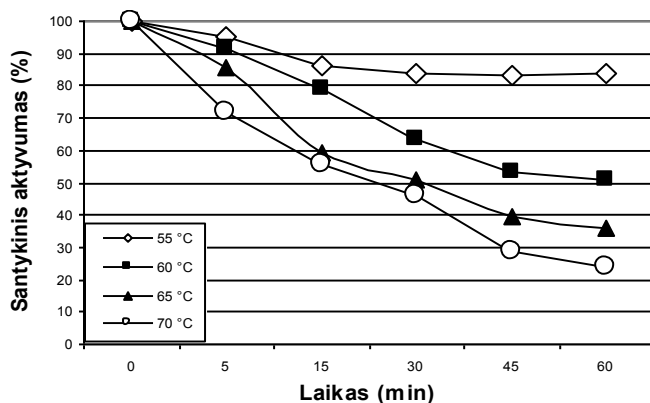
signalinį peptidą. Konstruojant rekombinantinę ksilanazę tikėtasi, jog papildomos N galėsios sekos (His inkarinė seka, T7 seka, trombino kirpimo vieta – 34 aminorūgštys) turėtų sutrikdyti galimą signalinio peptido atpažinimą ir fermento sekreciją į ląstelės išorę, tačiau rezultatai rodo, kad *E. coli* baltymų sekrecijos sistema gana universali. Ji sugeba atpažinti gram teigiamosios bakterijos signalinį peptidą nepaisant papildomos prie jo prijungtos aminorūgščių sekos, kuri ilgesnė nei pats signalinis peptidas. Kadangi nikelio afininės chromatografijos metodas neleidžia visiškai išgryninti tikslinio baltymo, matomai, nedidelis kiekis sekretuojamos ksilanazės liko baltymų mišinyje po gryninimo.

### 3.10 Rekombinantinės ksilanazės charakteristika

Rekombinantinė ksilanazė pasižymi aktyvumu plačiame temperatūros (3.10.1 pav., (1)) bei pH (3.10.1 pav., (2)) intervale. Šis fermentas efektyviausiai skaido ksilaną esant 70 °C temperatūrai, o jo pH veikimo optimumas yra 6,0.



3.10.1 pav. Rekombinantinės ksilanazės veikimo priklausomybė nuo temperatūros (1) ir pH (2).



3.10.2 pav. Temperatūros poveikis rekombinantinės ksilanazės stabilumui.

esant 65 bei 70 °C fermentas išlaiko tik ~50 % aktyvumo (3.10.2 pav.).

Rekombinantinis baltymas pasižymi termostabilumu esant skirtingoms temperatūroms: 55, 60, 65, 70 °C (3.10.2 pav.). Po 60 min inkubavimo esant 55 °C temperatūrai fermentas išlaiko 84 % aktyvumo, o esant 60 °C temperatūrai atitinkamai 51 %. Dar aukštesnėse temperatūrose rekombinantinės ksilanazės stabilumas mažėja: jau po 30 min inkubavimo

Kai kurių sunkiųjų metalų jonai, pavyzdžiui, divalentės geležies, inhibuoja ksilanazės veikimą, o mangano jonas nežymiai padidina fermentinį aktyvumą. Taip pat nustatyta, kad vienvalečiai kationai, tokie kaip natrijs ir kalis nežymiai sumažina ksilanazės aktyvumą. Kitų metalų jonai, tokie kaip  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  neturi įtakos ksilanazės aktyvumui. Duomenys pateikti 3.10.1 lentelėje.

**3.10.1 lentelė.** Metalų jonų įtaka rekombinantinės ksilanazės veikimui

Metalų jonai (1 mM)	Ksilanazės aktyvumas (%)
NaCl	96,8
KCl	95,1
MgCl <sub>2</sub>	99,75
CoCl <sub>2</sub>	99,26
MnCl <sub>2</sub>	102,94
FeSO <sub>4</sub>	46,57
CaCl <sub>2</sub>	98,53
Jokio metalo	100

Kadangi rekombinantinės ksilanazės savybės nustatytos naudojant baltymų mišinį, kuriame buvo rekombinantinė ir sekretuojama ksilanazės, todėl papildomai buvo atliktos zimogramų analizės, siekiant tiksliau nustatyti pH, metalų jonų bei temperatūros poveikį fermentiniam aktyvumui ir stabilumui. Visi zimogramų analizės rezultatai atitiko ksilanazės aktyvumų nustatymą DNS metodu.

Rekombinantinės ksilanazės substrato specifiskumas nustatytas inkubuoiant fermentą su ksilanu, karboksimetilceliulioze ir aviceliu. Rezultatai parodė, kad šis fermentas yra specifiskas tik ksilanui, jis nepasižymi celiuliaziniu (endo-1,4-β-gliukanaziniu) aktyvumu, t.y. neskaido karboksimetilceliuliozės ir avicelio.



#### 4. REZULTATŲ APITARIMAS

Visos žinomos *Geobacillus* genties bakterijos priskiriamos prie termofilinių mikroorganizmų, tačiau natūralios jų užimamos nišos neapsiriboja geotermine aplinka. Jos aptinkamos sausumoje, vandenyje ir netgi itin šaltose vietose. Dėl savybių adaptuotis prie skirtingų sąlygų ir didelės įvairovės jose aptinkamų fermentų, šios genties bakterijos įdomios tiek industrinei, tiek ir fundamentinei prasme (Feng ir kt., 2007).

Ksilanaziniu aktyvumu pasižymintis JK1 kamienas buvo išskirtas iš komposto. Tai natūrali aplinka, kurioje daug ksilano ir dėl mikroorganizmų poveikio galima pakankamai aukšta temperatūra, tačiau literatūros duomenimis *Geobacillus* genties bakterijų, sintetinančių ksilanazinius fermentus, kamienai išskiriami ne tik iš dirvožemio (Baba ir kt., 1994), medienos masės (Sharma ir kt., 2007), bet ir karštųjų versmių (Sabriye ir kt., 2007) bei vandenyno dugno karštųjų šaltinių (Wu ir kt., 2006). Remiantis 16S rRNR ir *spo0A* genų sekų palyginimais bei filogenetine analize JK1 kamienas buvo artimiausias *G. thermodenitrificans* NG80-2 kamienui, kuris išskirtas iš 2 km gylio naftos grežinio (Feng ir kt., 2007), ir jame taip pat aptiktas ksilanazės genas. Tai rodo, kad ksilanazių genų paplitimas tarp šios genties bakterijų nėra tiesiogiai susijęs su užimamomis ekologinėmis nišomis, tačiau greičiausiai perduotas iš bendro protėvio. Didesnė dalis *Geobacillus* gentyje žinomų ksilanazių nustatytos atlikus genomų sekoskaitą ir tik kelios ksilanazės patvirtintos baltymo lygyje charakterizuojant fermento savybes (Khasin ir kt., 1993; Baba ir kt., 1994; Wu ir kt., 2006; Sharma ir kt., 2007; Sabriye ir kt., 2007). Palyginus klonuotos JK1 ksilanazės geno seką su duomenų bazėse esančiomis sekomis nustatyta, jog ji 100 % identiška *G. thermodenitrificans* NG80-2 kamieno ksilanazės genui, rastam vykdant genomų sekoskaitą. Tačiau darbų, patvirtinančių šio fermento ekspresiją ir savybes *G. thermodenitrificans* NG80-2 kamieno, nėra. Todėl galima teigti, kad darbe charakterizuojama iki šiol nežinomomis savybėmis pasižyminti *Geobacillus* genties ksilanazė.

Sukonstruota JK1 rekombinantinė ksilanazė pasižymi aktyvumu plačiame temperatūros intervale (50-80 °C). Optimali jos veikimo temperatūra - 70 °C, kaip ir rekombinantinės bei natyvios ksilanazių iš *Geobacillus* sp. MT-1 (Wu ir kt., 2006). Ksilanazė iš *G. stearothermophilus* T-6 pasižymi didžiausiu aktyvumu ties 75 °C (Khasin ir kt., 1993), o *G. thermoleovorans* ksilanazės veikimo optimumas 80 °C (Sharma ir kt., 2007). Nors optimalios fermentų veikimo temperatūros gana panašios, JK1 ksilanazė išsiskiria kalbant apie termostabilumą. Šiame darbe parodyta, kad rekombinantinė ksilanazė išlaiko daugiau nei 80 % aktyvumo po valandos inkubavimo esant 55 °C temperatūrai ir fermentas praranda pusę aktyvumo po valandos inkubacijos esant 60 °C bei po 30 min inkubacijos esant 65 ir 70 °C temperatūroms. Kitos čia minimos ksilanazės pasižymi didesniu termostabilumu lyginant su

tiriama rekombinantine ksilanaze. Manoma, jog *G. stearothermophilus* T-6 ksilanazės termostabilumas susijęs su 233 padėtyje esančiu metioninu bei 220 padėtyje esančiu alaninu, tarp kurių atsiranda hidrofobiškos sąveikos bei stiprus joninis ryšys tarp asparto rūgšties 227 (neigiamai įkrautos) ir arginino 222 (teigiamai įkrauto) (Saksono ir Sukmarini, 2010). Tiriamos JK1 kamieno ksilanazės aminorūgščių sekos panašumas su *G. stearothermophilus* T-6 ksilanaze siekia 85 % ir regione, kuriame išsidėsto aukščiau minėtos aminorūgštys skiriasi nuo T-6 kamieno keliomis aminorūgštimis. Tai galėtų būti paaiškinimas, kodėl tiriamos ksilanazės termostabilumas sumažėjęs ir tuo pačiu patvirtina nuomonę, jog 220-233 esančios aminorūgštys įtakoja ksilanazės termostabilumą.

Analizuojant metalų jonų įtaką JK1 kamieno ksilanazei nustatyta, kad divalentės geležies jonai stipriai inhibuoja ksilanazės veikimą, fermento aktyvumas sumažėja daugiau nei 50 %. Taip pat parodyta, kad mangano jonas nežymiai padidina ksilanazės aktyvumą, o natrio ir kalio jonų buvimas nežymiai sumažina tiriamo baltymo veikimą. Tokie metalų jonai kaip kalcis, magnis ir kobaltas neturi įtakos rekombinantinės ksilanazės veikimui. Gana panašiai metalų jonai veikia *G. stearothermophilus* T-6 ksilanazę, kuri taip pat inhibuojama divalentės geležies jonais, nors ją nežymiai inhibuoja ir kobaltas bei manganas. Vienvalenčiai kationai (natrio, kalio) neturėjo įtakos fermento aktyvumui. *Geobacillus* sp. MT-1 rekombinantinę ksilanazę dalinai inhibavo magnio ir kalcio jonai, o manganas ir kobaltas veikė kaip stiprūs inhibitoriai. Tuo tarpu vienvalenčiai kationai aktyvumą didino. *G. thermoleovorans* ksilanazę stipriai inhibuoja kobalto jonas, magnio jonas aktyvumą padidina, o divalentės geležies, mangano ir kalcio jonai įtakos aktyvumui neturi. Reikia pastebėti, kad JK1 kamieno ksilanazė iš kitų išsiskiria tuo, jog yra nejautri kobalto jonams, kurie likusias ksilanazes veikia inhibuojančiai.

JK1 rekombinantinė ksilanazė turi specifiskumą tik ksilanui ir nepasižymi celiuliaziniu aktyvumu. Tos pačios savybės būdingos *G. thermoleovorans* ksilanazei. *G. stearothermophilus* T-6 ksilanazė pasižymi endogliukanaziniu aktyvumu, kas riboja jos galimą pritaikymą popieriaus pramonėje. Kaip jau minėta literatūros apžvalgoje, apie *Geobacillus* sp. MT-1 ksilanazės specifiskumą substratui duomenų nėra.

Rekombinantinės JK1 ksilanazės optimalus veikimo pH yra 6,0. Tai labai panašu į *G. stearothermophilus* T-6 ksilanazės pH optimumą - tarp 6,5-7 ir *Geobacillus* sp. MT-1 rekombinantinės ksilanazės (pH 7,0) bei natyvios (pH 6,5). Labiau išsiskiria *G. thermoleovorans* ksilanazė, kurios optimaliam veikimui reikia šarminės aplinkos (pH 8,5).

Apibendrinant reiktų pasakyti, jog *Geobacillus* genties bakterijų ksilanazės savo savybėmis gana panašios, tačiau kiekviena jų turi savo unikalių savybių. Šiame darbe charakterizuojama *G. thermodenitrificans* JK1 kamieno ksilanazė akivaizdžiai skiriasi nuo kitų

*Geobacillus* genties ksilanazių. Taip pat reiktų pabrėžti, kad šis fermentas yra pirma taip išsamiai charakterizuota *G. thermodenitrificans* ksilanazė.

## IŠVADOS

1. Atrinktas ksilanoliziniu aktyvumu pasižymintis termofilinis *G. thermodenitrificans* JK1 kamienas.
2. Atlikta heterogeninė rekombinantinės JK1 kamieno ksilanazės ekspresija *E. coli* ląstelėse, fermento gryninimas ir savybių nustatymas.
3. *G. thermodenitrificans* JK1 kamieno ksilanazės analizė rodo, jog tai naujas iki šiol literatūroje neaprašytas fermentas, turintis savybių, išskiriančių jį iš žinomų *Geobacillus* genties bakterijų ksilanazių.

# SANTRAUKA

Julija Gerasimova

## ***Geobacillus thermodenitrificans* JK1 kamieno termostabilios ksilanazės geno klonavimas, ekspresija ir fermento savybių analizė**

Ksilanas - pagrindinis hemiceliuliozės komponentas ir antras pagal paplitimą polisacharidas gamtoje. Šis biologinis polimeras yra chemiškai heterogeniška bei kompleksiška medžiaga, kurios efektyviam degradavimui reikalingos multifermentinės sistemos. Tokios sistemos yra plačiai paplitusios tarp įvairių prokariotinių ir eukariotinių mikroorganizmų. Pagrindinį vaidmenį ksilano degradacijoje atlieka endo-1,4- $\beta$ -ksilanazės. Ksilanazės pasižyminčios termostabilumu yra plačiai taikomas popieriaus ir maisto pramonėje, pašarų gamyboje bei biokonversijoje.

Darbo metu buvo atrinktas JK1 kamienas, gebantis sekretuoti ksilanolizinius fermentus į ląstelės išorę. Remiantis 16S rRNR ir *spo0A* genų sekų palyginimais bei filogenetine analize nustatyta, kad tiriamas kamienas buvo artimiausias *G. thermodenitrificans* NG80-2 kamienui, kuriame taip pat nustatytas ksilanazės genas. Pagal šią geno seką sukurti pradmenys amplifikuojantys JK1 kamieno ksilanazės geną (1224 bp). Ksilanazės genas klonuotas ir perkeltas į ekspresijos vektorių (pET-28c(+)), sukonstruojant rekombinantinę ksilanazę su His inkarine uodega (50,979 kDa), kas leido ekspresuoti baltymą *E. coli* ir atlikti gryninimą nikelio afininės chromatografijos metodu. Šiame darbe pirmą kartą charakterizuota *G. thermodenitrificans* JK1 kamieno ksilanazė. Rekombinantinio fermento optimalios veikimo sąlygos - 70 °C temperatūra ir pH 6,0. Šis fermentas yra specifiškas tik ksilanui. Taip pat buvo parodyta, kad rekombinantinė ksilanazė yra termostabilus fermentas.

## SUMMARY

**Julija Gerasimova**

### **Cloning, expression and biochemical characterization of the thermostable xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* strain JK1**

Xylan is a major structural polysaccharide in plant cells, and is the second most abundant polysaccharide in nature. Due to its heterogeneity and complexity, the complete hydrolysis of xylan requires a variety of cooperatively acting enzymes. These xylanolytic enzyme systems are quite widespread among prokaryotic and eukaryotic microorganisms. Endo-1,4- $\beta$ -xylanase is considered to play the most important role in xylan degradation. Thermostable xylanases have potential applications in a wide range of industrial processes, including pulp and paper industry, food and animal feeds industry and bioconversion.

In this study a thermophilic JK1 strain producing xylanolytic enzymes was isolated from compost sample. The 16S rRNA and *spo0A* genes sequence analysis indicated that JK1 strain had the highest similarity with *G. thermodenitrificans* NG80-2 strain. Based on the xylanase gene sequence from *G. thermodenitrificans* NG80-2 strain, degenerated primers were designed for amplification of xylanase-coding gene (1224 bp) from JK1 strain. Subsequently, the amplified gene was cloned into expression vector (pET-28c(+)) and the recombinant xylanase with a polyhistidine-tag was designed (50,979 kDa). Biochemical properties of the purified by nickel affinity chromatography recombinant xylanase from *G. thermodenitrificans* JK1 strain were further characterized. The optimal activity of recombinant enzyme was obtained at 70 °C and pH 6,0. It was shown, that this enzyme is thermostable and cellulase-free.

## **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovei Dr. Nomedai Kuisienei už pasitikėjimą, kantrybę ir vertingus patarimus ruošiant šį darbą. Taip pat norėčiau padėkoti Prof. Dr. Donaldui Čitavičiui už gyvenimiškus patarimus ir supratimą.

Ypatingai dėkoju Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros studentams ir darbuotojams už pastovų palaikymą, paskatinimą ir nuostabią darbo atmosferą.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Baba T, Shinke R, Nanmori T. Identification and characterization of clustered genes for thermostable xylan-degrading enzymes,  $\beta$ -xylosidase and xylanase, of *Bacillus stearothermophilus* 21. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994; 60(7): 2252-58.
2. Battan B, Sharma J, Dhiman SS, Kuhad RC. Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007; 41: 733-39.
3. Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001; 56: 326-38.
4. Berrin JG, Juge N. Factors affecting xylanase functionality in the degradation of arabinoxylans. *Biotechnology Letters*. 2008; 30: 1139-50.
5. Butt MS, Tahir-Nadeem M, Ahmad Z, Sultan MT. Xylanases and their applications in baking industry. *Food Technology and Biotechnology*. 2008; 46(1): 22-31.
6. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acid Research*. 2009; 37.
7. Chatterjee A, Das NC, Raha S, Babbit R, Huang Q, Zaitlin D, Maiti IB. Production of xylanase in transgenic tobacco for industrial use in bioenergy and biofuel applications. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2010; 46: 198-209.
8. Cheng HL, Tsai CY, Chen HJ, Yang SS, Chen YC. The identification, purification, and characterization of STXF10 expressed in *Streptomyces thermonitrificans* NTU-88. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009; 82: 681-89.
9. Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005; 3-23.
10. Davies G, Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Current biology*. 1995; 3: 853-59.
11. Dhiman SS, Sharma J, Battan B. Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review. *BioResources*. 2008; 3(4): 1377-402.
12. Dodd D, Cann IKO. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *Global Change Biology. Bioenergy*. 2009; 1(1): 2-17.
13. Ducros V, Charnock SJ, Derewenda U, Derewenda ZS, Dauter Z, Dupont C, Shareck F, Morosoli R, Kluepfel D, Davies GJ. Substrate specificity in glycoside hydrolase family 10. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(30): 23020-26.



14. Feng L, Wang W, Cheng J, Ren Y, Zhao G, Gao C, Tang Y, Liu X, Han W, Peng X, Liu R, Wang L. Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from deep-subsurface oil reservoir. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007; 104 (13): 5602-07.
15. Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource Technology. 2003; 89: 17-34.
16. Jeong MJ, Kim S, Yun CW, Choi YJ, Cho SG. Engineering a de novo internal disulfide bridge to improve the thermal stability of xylanase from *Bacillus stearothermophilus* No. 236. Journal of Biotechnology. 2007; 127: 300-309.
17. Kaur A, Mahajan R, Singh A, Garg G, Sharma J. Application of cellulase-free xylanopectinolytic enzymes from the same bacterial isolate in biobleaching of kraft pulp. Bioresource Technology. 2010; 101: 9150-55.
18. Khandeparker R, Numan TM. Bifunctional xylanase and their potential use in biotechnology. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2008; 35: 635-44.
19. Khasin A, Alchanati I, Shoham Y. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. Applied and Environmental Microbiology. 1993; 59(6): 1725-30.
20. Kuisiene N, Raugalas J, Chitavichius D. Phylogenetic, inter, and intraspecific sequence analysis of *spo0A* gene of the genus *Geobacillus*. Current Microbiology. 2009; 58: 547-53.
21. Miyazaki K, Takenouchi M, Kondo H, Noro N, Suzuki M, Tsuda S. Thermal stabilization of *Bacillus subtilis* family-11 xylanase by directed evolution. The Journal of Biological Chemistry. 2006; 281(15): 10236-42.
22. Rosenberg IM. Protein analysis and purification. 2nd ed. Boston: Birkhauser, 2005.
23. Sabriye C, Inan K, Kacagan M, Belduz AO. Evaluation of arabinofuranosidase and xylanase activities of *Geobacillus* spp. isolated from some hot springs in Turkey. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2007; 17(8): 1262-70.
24. Saha BC. Hemicellulose bioconversion. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2003; 30: 279-91.
25. Saksono B, Sukmarini L. Structural analysis of xylanase from marine thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* in Tanjung Api, Poso, Indonesia. Hayati Journal of Biosciences. 2010; 17(4): 189-97.
26. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

27. Sharma A, Adhikari S, Satyanarayana T. Alkali-thermostable and cellulase-free xylanase production by an extreme thermophilic *Geobacillus thermoleovorans*. *World Journal of Microbiology and biotechnology*. 2007; 23: 483-90.
28. Shin ES, Yang MJ, Jung KH, Kwon EJ, Jung JS, Park SK, Kim J, Yun HD, Kim H. Influence of the transposition of the thermostabilizing domain of *Clostridium thermocellum* xylanase (XynX) on xylan binding and thermostabilization. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; 68(7): 3496-501.
29. Simpson HD, Haufler UR, Daniel RM. An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga*. *Biochemical Journal*. 1991; 277: 413-17.
30. Studholme DJ, Jackson RA, Leak DJ. Phylogenetic analysis of transformable strains of thermophilic *Bacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*. 1999; 172: 85-90.
31. Subramaniyan S, Prema P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2002; 22(1): 33-46.
32. Sunna A, Gibbs MD, Bergquist PL. A novel thermostable multidomain 1,4- $\beta$ -xylanase from *Caldibacillus cellulovorans* and effect of its xylan-binding domain on enzyme activity. *Microbiology*. 2000; 146: 2947-55.
33. Takao M, Yamaguchi A, Yoshikawa K, Terashita T, Sakai T. Molecular cloning of the gene encoding thermostable endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinase of *Bacillus thermodenitrificans* TS-3 and its expression in *Bacillus subtilis*. *Biosciences, Biotechnol, and Biochemistry*. 2001; 66(2): 430-33.
34. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007; 24: 1596-99.
35. Wong KKY, Tan LUL, Saddler JN. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*. 1988; 52(3): 305-17.
36. Wu S, Liu B, Zhang X. Characterization of a recombinant thermostable xylanase from deep-sea thermophilic *Geobacillus* sp. MT-1 in East Pacific. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006; 72: 1210-16.
37. Zaide G, Shallom D, Shulami S, Zolotnitsky G, Golan G, Baasov T, Shoham G, Shoham Y. Biochemical characterization and identification of catalytic residues in  $\alpha$ -glucuronidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *European Journal of Biochemistry*. 2001; 268: 3006-16.

38. Zhang ZG, Yi ZL, Pei XQ, Wu ZL. Improving the thermostability of *Geobacillus stearothermophilus* xylanase XT6 by directed evolution and site-directed mutagenesis. *Bioresource Technology*. 2010; 101: 9272-78.
39. Zhu H, Paradis FW, Krell PJ, Phillips JP, Forsberg CW. Enzymatic specificities and modes of action of the two catalytic domains of the XynC xylanase from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Journal of Bacteriology*. 1994; 176(13): 3885-94.