

УДК 577.152.3

Клонирование, выделение и изучение свойств новой рекомбинантной танназы *Aspergillus niger*

© 2021 Д.О. ОСИПОВ^{1*}, В.Ю. МАТЫС², В.А. НЕМАШКАЛОВ², А.М. РОЖКОВА¹,
И.А. ШАШКОВ¹, А.Д. САТРУТДИНОВ¹, Е.Г. КОНДРАТЬЕВА¹, А.П. СЕНИЦЫН^{1,3}

¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, 119071

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук, Пущино, 142290

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

*e-mail: doosipov@gmail.com

Поступила в редакцию 20.05.2021 г.

После доработки 20.07.2021 г.

Принята в печать 22.07.2021 г.

Исследована новая рекомбинантная танназа (танинацилгидролаза) *Aspergillus niger*, продуцируемая грибом *Penicillium verruculosum*. С помощью клонирования в штамме-реципиенте гена *tan2* (GenBank AN: MT828303) получен штамм-продуцент с высоким уровнем секреции внеклеточной танназы ТАН2 (80% от общего внеклеточного белка). Ферментный препарат танназы разрушал танины в экстрактах черного чая. С помощью хроматографических методов в гомогенном виде выделен белок ТАН2 с высокой ферментативной активностью по отношению к галлотанину (53 ед/мг) и меньшей — к пропилогаллату (4,7 ед/мг). Гомогенный белок ТАН2 характеризовался температурным оптимумом 45 °С и рН-оптимумом при 3,5. При температуре 50 °С ТАН2 сохранял более 80% активности в течение 3 ч, при 60 °С — около 75% активности в течение 90 мин, при 70 °С фермент полностью инактивировался в течение 10 мин. Выделенный фермент отличался высокой устойчивостью к NaCl — активность по галлотанину не падала ниже 50% от исходной в растворах соли с концентрацией до 5 М. Активность ТАН2 возрастала в присутствии Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ на 3–64% и снижалась на 4–65% в присутствии ионов Co²⁺, Fe³⁺ и Fe²⁺.

Ключевые слова: танназа, танины, *Aspergillus niger*, *Penicillium verruculosum*

doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-6-25-33

Танназы (танинацилгидролазы, КФ 3.1.1.20) — ферменты микроорганизмов, относящиеся к сериновым эстеразам, которые гидролизуют эфиры галловой кислоты галлотанинов с образованием галловой кислоты и глюкозы, а также избирательно отщепляют галловую кислоту от эллагитанинов [1, 2].

Танины представляют собой четвертый по распространенности полимер растительного происхождения после целлюлозы, гемицеллюлоз и лигнина [3]. Их условно разделяют на гидролизуемые и конденсированные (последние не гидролизуются танназами) [4]. Практически важными продуктами биотрансформации танинов являются вещества с антиоксидантными свойствами [5], модифицированные катехины, а также галловая кислота, которая находит применение, как исходное сырье в фармацевтической

промышленности и производстве красителей [6]. Танины присутствуют в сточных водах кожевенных и пищевых производств [7], которые могут быть подвергнуты ферментативной обработке. Присутствием танинов объясняется горечь и помутнение соков и вин, от этих нежелательных факторов избавляются с помощью танназ [8]. Широко распространено применение танназ в производстве чая и напитков на его основе [9]. В среде органических растворителей танназы катализируют реакцию образования из танинов пропилогаллата [10] — важного пищевого антиоксиданта. Танназы добавляют в зубные пасты для удаления потемнений зубной эмали, причиной которой являются танины, входящие в состав кофе и чая [11].

Как любые востребованные промышленностью ферменты, танназы требуются

в большом количестве, поскольку мировой спрос, например на галловую кислоту, составляет 8000 т/год [12]. Для рентабельности крупномасштабного производства танназы целесообразно, на наш взгляд, использовать методы генетической инженерии и систему экспрессии гриба *Penicillium verruculosum* [13]. Это связано с тем, что рекомбинантные штаммы *P. verruculosum* характеризуются высокой продуктивностью, секретируя до 60 г/л общего белка, в котором доля целевых гетерологичных ферментов может составлять до 80% [14].

Цель данной работы заключалась в клонировании новой танназы *Aspergillus niger* в системе экспрессии реципиентного штамма *P. verruculosum* 537 (Δ niaD), ее выделение в гомогенном виде, изучение свойств, а также проведение прикладного эксперимента для определения сферы применения ферментного препарата танназы.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы

В работе в качестве штамма-реципиента использован ауксотрофный штамм *P. verruculosum* 537 (Δ niaD); бактериальный штамм *Escherichia coli* Mach1TM T1 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) использован для субклонирования гена танназы *tan2*; штамм *Aspergillus niger* NRRL 3536 — для получения геномной ДНК.

Реагенты

Реактивы для буферных растворов были приобретены у фирм Bio-Rad (США), «Хеликон» и «Реахим» (Россия); танин (галлотанин) — у фирмы Panreac (Германия), а пропилгаллат был предоставлен ООО «БиоМир» (Россия).

Аmplификация и клонирование

Для амплификации гена танназы в качестве матрицы использована геномная ДНК штамма *A. niger* NRRL 3536, выделенная с помощью набора DNeasyPlant Mini Kit (Qiagen, США). Олигонуклеотидные праймеры сконструированы на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей танназ различных представителей грибов рода *Aspergillus*; для обеспечения безрестриционного лигирования на 5'-концы олигонуклеотидов введены дополнительные последовательности (16–23 п. н.):

Tan2-LIC5: 5'-CAAACAGAAGCAACCGACACAATGCGCTCCAAGATGAGCCTTCTGGCCGGCA-3',

Tan2-LIC3: 5'-GAGGAGAAGCCCGGTCTAATACAGCGGCAGCTCGTAAGCATCAAAATC-3'.

ПЦР проводили с использованием Long DNA Polymerase Mix (Thermo Fisher Scientific) по следующей программе: 5 мин при 95 °С, [1,5 мин при 95 °С, 2 мин при 50 °С, 2 мин при 68 °С] в течение 30 циклов, 10 мин при 68 °С.

Продукт амплификации выделяли из агарозного геля с помощью набора QiAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

Конструкция, содержащая последовательность целевого гена, получена методом независимого лигирования [15]. Для этого полученный фрагмент и линейаризованный вектор pUC-SВНI, содержащий промоторную и терминаторную области гена *cbh1* гриба *P. verruculosum*, обрабатывали T4-ДНК полимеразой (Thermo Fisher Scientific) при 22 °С в течение 30 мин и затем 30 мин при 80 °С (в присутствии dATP для вставки и dTTP для вектора). Последующее лигирование вектора и вставки проводили в течение 20 мин при 22 °С.

Клетки *E. coli* Mach1 (F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 *hsdR*(r_K⁻, m_K⁺) Δ recA1398 *endA1 tonA*) трансформировали полученной конструкцией pСВНI-Tan2 по стандартной методике [16]. Колонии отбирали на селективной среде LB с ампициллином (100 мкг/мл). Наличие вставки целевого гена подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру. Ген *tan2* полностью секвенирован и депонирован в GenBank под номером MT828303.

Трансформация штамма-реципиента *P. verruculosum* 537 (Δ niaD)

Трансформацию протопластов штамма-реципиента проводили по модифицированному CaCl₂-ПЭГ методу [17], используя конструкцию pСВНI-Tan2 вместе с котрансформирующей плазмидой pSTA10 (в массовом соотношении 10:1 соответственно). Первичную селекцию рекомбинантных штаммов проводили на агаризованной среде с 10 мМ NaNO₃.

Культивирование рекомбинантных штаммов и получение ферментных препаратов (ФП)

Рекомбинантные штаммы культивировали в 750-миллилитровых колбах Эрленмейера со 100 мл питательной среды для *P. verruculosum* (г/л): микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) — 40, пшеничные отруби — 10, дрожжевой экстракт — 10, КН₂РО₄ — 15, (NH₄)₂SO₄ — 5, СаСl₂·2Н₂О — 0,3, MgSO₄·7Н₂О — 0,3 — при 30 °С и перемешивании со скоростью 220 об/мин в течение 6 сут.

Отобранный продуцент культивировали далее в 1-литровом ферментере КФ-104/3 (ООО «Проинтех», Россия), используя питательную среду следующего состава (г/л): глюкозная

патока — 57,1, МКЦ — 40, пшеничные отруби — 10, кукурузный экстракт — 30, мочевины — 2,5, KH_2PO_4 — 14, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 10, CaCl_2 — 0,6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,6 (рН 5,0) — при 32 °С в течение 144 ч. В ходе ферментации трижды проводили подпитку глюкозной патокой и МКЦ.

Для получения сухого ФП культуральную жидкость (КЖ) после ферментации высушивали на распылительной сушке Mini Spray Dryer B-290 (Buchi AG, Швейцария).

Определение танназной активности

Ферментативную активность полученного целевого белка по отношению к танину определяли по начальной скорости образования галловой кислоты по ранее описанной методике [18] с модификациями. К 100 мкл раствора танина (0,3 мМ) в 0,1 М Na-цитратном буфере (рН 5,0) добавляли 100 мкл того же буфера и 100 мкл раствора фермента. Реакцию проводили в течение 5 мин при 30 °С и останавливали добавлением 100 мкл спиртового раствора роданина (0,667%). Через 5 мин в смесь вносили 80 мкл 0,5 М раствора KOH, еще через 5 мин — 1,6 мл дистиллированной воды. Реакционную смесь инкубировали 10 мин и измеряли оптическую плотность при 520 нм. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализировало образование 1 мкмоль продукта за 1 мин. Аналогичным образом определяли танназную активность с использованием в качестве субстрата пропилгаллата.

Кинетические константы (k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m) рассчитывали для реакции гомогенного фермента с использованием танина (0,0167–0,2000 М) в качестве субстрата. Реакцию проводили при 30 °С и рН 5,0.

Определение концентрации белка

Определение концентрации белка в ФП, КЖ и растворах гомогенных ферментов проводили методом Лоури, используя БСА в качестве стандарта [19]. Концентрацию белка во фракциях определяли по оптической плотности при 280 нм на спектрофотометре NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific).

Электрофорез белков

Электрофорез проводили в 12%-ном ПААГ с Na-ДДС на приборе MiniProtein (Bio-Rad) по инструкции производителя.

Выделение танназы

Выделение и очистку танназы проводили на хроматографической системе ÄKTA pure (GE Healthcare Life Sciences, США)

с УФ-детектором. Белок из раствора осаждали сульфатом аммония (80% от насыщения) и растворяли в 1 мл 0,05 М Na-ацетатного буфера (рН 5,0). Очистку проводили в два этапа: сначала на колонке Superdex 75, затем на колонке Superdex 200 (GE Healthcare Life Sciences). Белок элюировали 0,05 М Na-ацетатным буфером (рН 5,0) в изократическом режиме. Наличие целевого белка во фракциях контролировали по танназной активности с использованием танина в качестве субстрата. Массовую долю целевого белка в ФП рассчитывали как соотношение его массы во фракции к массе белка, нанесенного на колонку.

Идентификация танназы методом масс-спектрометрии

Масс-спектрометрический анализ проводили методом пептидного картирования после расщепления белка, содержащегося в соответствующей полосе геля, трипсином (Promega, США) [20]. MALDI-масс-спектрометрию трипсинового гидролизата проводили на времяпролетном масс-спектрометре UltrafleXtreme (Bruker Daltonik GmbH, Германия) в ЦКП «Промышленные биотехнологии» ФИЦ Биотехнологии РАН. Полученные данные интерпретировали путем сравнения масс полученных пептидов и теоретически рассчитанных с помощью онлайн-сервиса PeptideMass (http://web.expasy.org/peptide_mass/).

Влияние температуры и рН на ферментативную активность танназы

Влияние температуры и значения рН реакционной смеси анализировали в 0,1 М Na-цитратном буфере в диапазоне рН 3–7 и температур 30–70 °С. Танназную активность представляли в процентах от максимального значения в оптимальных условиях.

Анализ термостабильности танназы

Термостабильность целевого белка исследовали при 50, 60 и 70 °С в 0,1 М Na-цитратном буфере (рН 5,0). Растворы фермента инкубировали при заданной температуре в течение 10–180 мин. В отобранных через заданные промежутки времени пробах определяли танназную активность и выражали в процентах от исходной.

Влияние концентрации NaCl на танназную активность

Влияние концентрации NaCl на танназную активность очищенного белка анализировали в 0,1 М Na-цитратном буфере (рН 5,0) в присутствии 1, 2, 3, 4, 5 М NaCl по отношению к активности в отсутствие NaCl.

Влияние ионов металлов на танназную активность

Влияние ионов металлов на танназную активность очищенного белка анализировали в присутствии 1 мМ следующих солей: Ca^{2+} , Cd^{2+} (хлорид), Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} (сульфат), Co^{2+} , Pb^{2+} (ацетат), Fe^{2+} (сульфат) и Fe^{3+} (хлорид).

Приготовление чайного экстракта и определение содержания танинов

Один грамм листьев черного чая экстрагировали 80 мл дистиллированной воды с температурой 90 °С в течение 30 мин. Экстракт фильтровали через бумажный фильтр, фильтрат переносили в мерную колбу и доводили до 100 мл дистиллированной водой. Концентрацию танинов в чайных экстрактах определяли по методике с использованием хлорида железа III [21] с модификациями. Образец объемом 250 мкл смешивали при комнатной температуре с 500 мкл раствора БСА (1 мг/мл в 0,2 М Na-ацетатном буфере, pH 5,0, с 0,17 М NaCl). Смесь инкубировали 15 мин и центрифугировали при 10000 g, супернатант удаляли, а осадок промывали дистиллированной водой и растворяли в 1 мл раствора Na-ДДС и триэтаноламина (1% и 5% соответственно), после чего добавляли 250 мкл 0,01 М FeCl_3 в 0,01 N HCl, инкубировали 20 мин при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность при 510 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отбор штаммов-продуцентов танназы

Микробные танназы представлены ферментами с весьма широким диапазоном свойств [22]. Рекомбинантные штаммы-продуценты танназы, способные расти на чашках с нитратом натрия, культивировали в колбах на жидкой питательной среде. При электрофоретическом анализе полученных КЖ выявлено наличие клонов, в которых присутствовала белковая полоса в области 37–40 кДа, которой не было в штамме-реципиенте. Кроме того, в КЖ этих клонов обнаружена танназная активность — до 33 ед/мл, в то время как у штамма-реципиента танназная активность не выявлена. Масс-спектрометрический анализ трипсиновых гидролизатов этой белковой полосы показал наличие пептидов с m/z, идентичным теоретически рассчитанным в программе PeptideMAss (ExPASy), при этом покрытие аминокислотных последовательностей составило 57%. Полученные данные свидетельствуют об экспрессии гена танназы в реципиентном штамме *P. verruculosum* 537 ($\Delta niaD$).

Танназная активность ферментного препарата

Исследован сухой ФП танназы (ТАН2), представляющий собой высушенную с помощью лабораторной распылительной сушилки КЖ после ферментации в лабораторных ферментерах. На электрофореграмме ФП ТАН2 видна полоса в области 37–40 кДа (рис. 1). Данные по содержанию белка и удельной активности ФП ТАН2 в отношении субстратов: танина и пропилгаллата — приведены в табл. 1. Активность по отношению к танину для ФП ТАН2 в 14 раз выше, чем к пропилгаллату, что характерно для танназ [23].

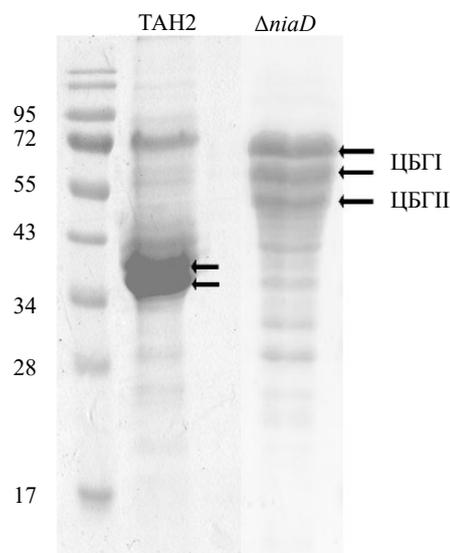


Рис. 1. Электрофореграмма сухого ФП ТАН2 (стрелками отмечены полосы, подвижность которых соответствует ожидаемой для ТАН2) и белков штамма-реципиента *P. verruculosum* 537 ($\Delta niaD$): целлюбиогидролазы I (ЦБГ I) и целлюбиогидролазы II (ЦБГ II).

Fig. 1. Electrophoregram of dry TAN2 enzyme prepate (arrows indicate bands corresponding to the enzyme) and recipient *P. verruculosum* 537 ($\Delta niaD$) strain: cellobiohydrolase I (CBHI) and cellobiohydrolase II (CBHII).

Таблица 1

Содержание и удельная активность танназы в ФП ТАН2

Tannase content and specific activity in EP TAN2

ФП	Белок, мг/г ФП	Гидролитическая активность, ед/г белка	
		Пропилгаллат	Танин
ТАН2	431 ± 16	550 ± 21	7 680 ± 233

Анализ электрофореграммы (рис. 1) с помощью программы GelAnalyzer 2010 показал, что доля

ТАН2 в сухом ФП составляет 80%, при этом общая масса ФП в 1 л КЖ составила 30,5 г, а содержание общего белка в ФП — 12,4 г. Контрольный ФП, полученный с помощью штамма-реципиента, содержал полный целлюлолитический комплекс: целлобиогидролазу II (ЦБГИ) и ЦБГII (их общее содержание — 60%) — и эндоглюканазы (12%), содержание других ферментов — 28% [13]). От исходного целлюлолитического комплекса штамма-реципиента в составе рекомбинантного ФП присутствовала только ЦБГИ (не более 10% от общего секретируемого белка). Как отмечалось выше, контрольный ФП не содержал танназу.

Свойства гомогенной рекомбинантной танназы

Гомогенный белок ТАН2 был выделен из ФП, полученного с помощью рекомбинантного штамма-продуцента, путем гель-фильтрации — последовательно на носителях Superdex 75 и Superdex 200. Стандартный метод фракционирования ФП, полученных на основе *P. verruculosum* [24], с помощью анионообменной и гидрофобной хроматографии оказался неприемлемым в виду гидрофобности молекулы танназы [25] — это приводило к их сильной неспецифической адсорбции на носителях и низкому выходу.

Гомогенная танназа обладала высокой гидролитической активностью по отношению к танину (63 ед/мг) и более низкой — по отношению к пропилгаллату (4,7 ед/мг). Меньшая активность к пропилгаллату может быть обусловлена тем, что танназная активность зависит от числа эфирных связей, образуемых заместителем с остатками галловой кислоты [26, 27]: чем их меньше, тем ниже активность. Такие значения активности согласуются с опубликованными данными для танназ из *A. niger* [28–30] и *Talaromyces* sp. [31]. Кинетические константы: k_{cat} , K_m , и k_{cat}/K_m — гидролиза танина, определенные по методу Лайнуивера-Берка, составили 4,26 с⁻¹, 0,083 мМ и 51,1 мМ⁻¹·с⁻¹ соответственно. Значения кинетических параметров коррелируют с литературными данными для грибных танназ [29, 31, 32].

Важными факторами, оказывающими влияние на каталитическую активность ферментов, являются температура и рН среды. Гомогенная ТАН2 имела оптимум активности при 45 °С (рис. 2а), при этом в интервале от 30 до 65 °С ферментативная активность снижалась не более чем на 50% от максимальной. Для нескольких исследованных ранее танназ из *Aspergillus niger* оптимальную активность регистрировали при более низкой температуре — 35 °С [28] — и при более высокой — 60 °С [29, 30]. Танназа из *Talaromyces verruculosus* также работала в температурном оптимуме 60 °С [33]; причем ее относительная активность была выше 50%

в интервале 45–75 °С. Такие свойства позволяют использовать танназу в процессах, где не допускается (или не требуется) чрезмерное нагревание, например в зубных пастах, производстве пропилгаллата и чайных напитков.

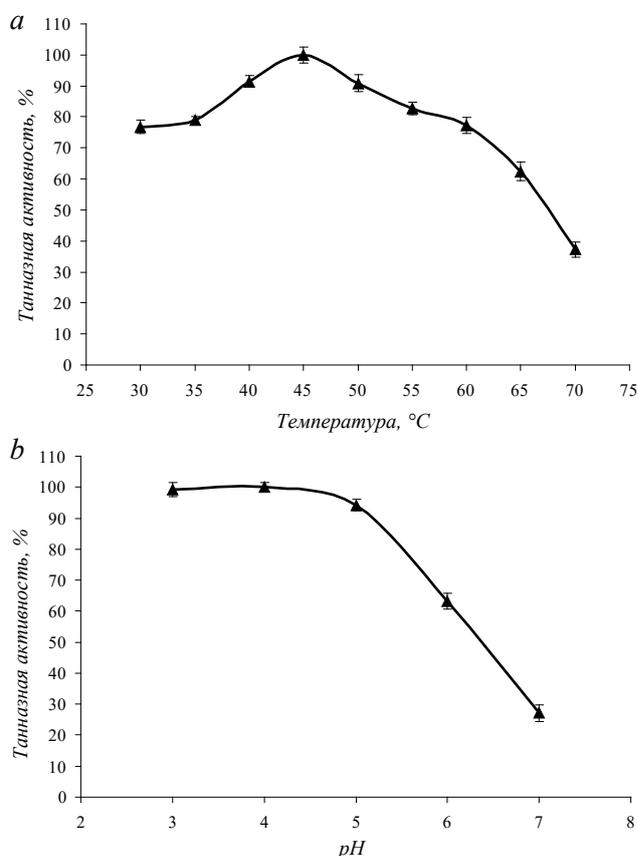


Рис. 2. Зависимость активности гомогенной танназы ТАН2 от температуры (а) и рН (b). Температурный оптимум работы фермента определяли, измеряя активность в течение 5 мин при различных температурах (30–70 °С) и рН 5, рН-оптимум — при различных значениях рН (3–7) и температуре 30 °С.

Fig. 2. Dependence of activity of homogeneous TAN2 on temperature (a) and pH (b). The temperature optimum of the enzyme was determined by measuring the activity for 5 min at different temperatures (30–70 °С) and pH 5, the pH optimum was analyzed at different pH values (3–7) and temperature of 30 °С.

Оптимальное значение рН для ТАН2 составило 3,5 (рис. 2b), фермент сохранял более 50% активности при рН от 3 до 6. Такое значение рН-оптимума существенно ниже, чем было отмечено для танназ из *Aspergillus* (рН 6) [28–30] и *Talaromyces* (рН 8) [33], которые сохраняли более 50% активности при рН 4–8.

Таким образом, исследованная нами новая танназа *Aspergillus niger* имеет общие с другими танназами свойства: ее активность зависит

от температуры и pH среды, хотя последнее смещено в сторону более низких значений.

Для ТАН2 проанализирована термостабильность в водном растворе при температурах 50, 60 и 70 °С и pH 4,5 (рис. 3). При 50 °С относительная активность ТАН2 оставалась выше 80% в течение 3 ч, при 60 °С в течение 90 мин сохранялось около 75% активности, при 70 °С полная инактивация происходила через 10 мин.

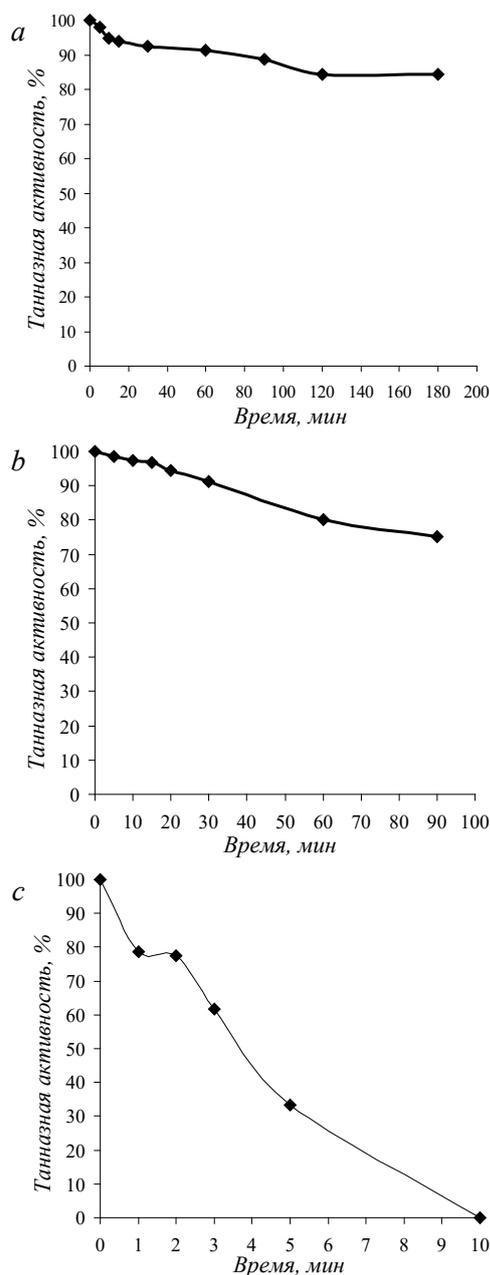


Рис. 3. Анализ стабильности гомогенной танназы ТАН2 при различных температурах: 50 (a), 60 (b) и 70 °С (c) — при pH 4,5. Исследована гидролитическая активность ТАН2 по отношению к танину.

Fig. 3. Stability of homogeneous TAN2 at different temperatures: 50 (a), 60 (b) and 70 °C (c) — at pH 4.5. The hydrolytic activity of TAN2 toward tannin was investigated.

Гомогенная танназа ТАН2 устойчива к высоким концентрациям NaCl (рис. 4). Фермент сохранял 100% активности в 1–2 М NaCl и до 57% в 5 М NaCl (в литературе описана танназа бактериального происхождения, способная выдерживать концентрацию соли до 4 М [34], устойчивость к действию соли некоторых бактериальных [35] и грибных [36] танназ обычно не так высока). Танназы, устойчивые к действию NaCl, могут найти применение для очистки сточных вод, содержащих танины.

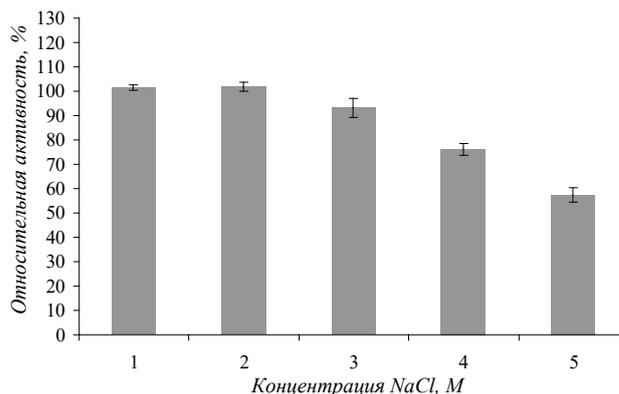


Рис. 4. Влияние концентрации NaCl в реакционной смеси на танназную активность гомогенной ТАН2 при 30 °С и pH 5,0. За 100% принимали гидролитическую активность ТАН2 по отношению к танину в 0,1 М Na-цитратном буфере, pH 5,0.

Fig. 4. Effect of NaCl concentration in the reaction mixture on the activity of homogeneous TAN2 at 30 °C and pH 5.0. 100% was taken as hydrolytic activity of TAN2 in 0.1 M Na-citrate buffer, pH 5.0.

Катионы различных металлов по-разному влияют на ферментативную активность танназ. Катионы могут действовать как солевые мостики, поддерживая конформацию белка или стабилизируя связи в комплексе фермент–субстрат. Мы исследовали влияние катионов различных металлов (в концентрации 1 мМ) на гидролитическую активность гомогенной ТАН2 (табл. 2). Активность фермента возрастала в присутствии Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} на 3–64% и падала в присутствии катионов Co^{2+} , Fe^{3+} и Fe^{2+} , которые могут взаимодействовать с тиоловыми группами ферментов [34]. Интересно, что Zn^{2+} и Cu^{2+} не ингибировали ферментативную активность ТАН2, в отличие от других танназ грибного происхождения [32, 37].

Влияние ФП ТАН2 на чайные экстракты

Присутствие танинов в продуктах растительного происхождения служит причиной помутнения чайных экстрактов, что является нежелательным побочным процессом при производстве

Таблица 2

Относительная активность гомогенной танназы ТАН2 в присутствии катионов металлов

Relative activity of homogeneous TAN2 tannase in the presence of metal cations

Катион	Танназная активность, %
Ca ²⁺	103 ± 4
Mg ²⁺	106 ± 3
Zn ²⁺	116 ± 3
Mn ²⁺	116 ± 2
Fe ²⁺	35 ± 1
Fe ³⁺	75 ± 1
Cu ²⁺	134 ± 6
Co ²⁺	69 ± 33
Cd ²⁺	120 ± 3
Pb ²⁺	127 ± 3

Примечание: Концентрация катионов — 1 мМ; за 100% принята гидролитическая активность ТАН2 в Na-цитратном буфере (рН 5,0).

Note: The concentration of cations was 1 mM; the hydrolytic activity of TAN2 in Na-citrate buffer (pH 5.0) was taken as 100%.

чайных напитков [38, 39]. Связывание танинов с белками с образованием нерастворимых агрегатов снижает усвояемость кормов [40, 41].

Способность ФП ТАН2 гидролизовать содержащиеся в чайных листьях танины исследована нами на свежих экстрактах (1%) черного чая. К чайному экстракту в емкости объемом 20 мл добавляли 10 мг (по белку) ФП ТАН2. Смесь инкубировали при 30 °С в течение 1,5 ч при рН 4,5. Содержание танинов в образцах определяли по методу с осаждением БСА (см. раздел «Условия эксперимента»). Согласно полученным данным (рис. 5), содержание танинов снижалось на 70–80% уже через 30 мин инкубации с ФП ТАН2.

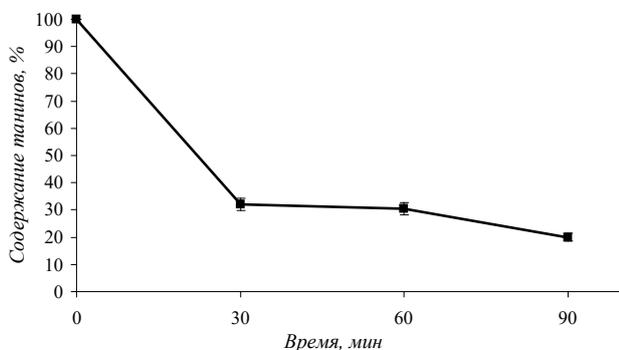


Рис. 5. Снижение содержания танинов в чайных экстрактах, обработанных ФП ТАН2.

Fig. 5. Reducing the tannin content in tea extracts treated with EP TAN2.

Таким образом, в результате проведенного исследования ген внеклеточной танназы плесневого гриба *Aspergillus niger* был клонирован и экспрессирован в новом штамме-продуценте *Penicillium verruculosum*. Содержание секретируемого целевого белка — танназы (ТАН2) — составило 80% от общего внеклеточного белка (12,4 г белка из 1 л культуральной жидкости). Рекombинантная танназа выделена и очищена до гомогенного состояния, что позволило исследовать влияние различных факторов на ее ферментативную активность. Гомогенный белок ТАН2 проявляет активность по отношению к таннину и пропилгаллату. Оптимум действия фермента располагался при относительно невысоких температурах и в кислой области. Активность сохраняется в течение долгого времени при повышенных температурах. Рекombинантная танназа ТАН2 устойчива к высоким концентрациям NaCl. Активность ТАН2 возрастала в присутствии Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ и уменьшалась в присутствии ионов Co²⁺, Fe³⁺ и Fe²⁺.

Нами показано, что полученный ферментный препарат, ФП ТАН2, гидролизует танины в свежих экстрактах черного чая, что может быть использовано для обработки чайного листа в процессе ферментации для модификации цвета напитка и предотвращения образования чайной мути.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aguilar C.N., Gutierrez-Sanchez G. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. *Food Sci. Technol. Int.*, 2001, 7, 373–382. doi: 10.1106/69M3-B30K-CF7Q-RJ5G
2. Rajak R.C., Singh A., Banerjee R. Biotransformation of hydrolysable tannin to ellagic acid by tannase from *Aspergillus awamori*. *Biocatal. Biotransformation*, 2017, 35, 27–34. doi: 10.1080/10242422.2016.1278210
3. García D.E., Glasser W.G., Pizzi A., et al. Modification of condensed tannins: from polyphenol chemistry to materials engineering. *New J. Chem.*, 2016, 40, 36–49. doi: 10.1039/C5NJ02131F
4. Sieniawska E., Baj T. Tannins. In *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies*. Eds S. Badal & R. Delgado, Academic Press, Amsterdam, 2017, p. 202.
5. Niho N., Shibutani M., Tamura T., et al. Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, 2001, 39, 1063–1070. doi: 10.1016/S0278-6915(01)00054-0

6. Bajpai B., Patil S. A new approach to microbial production of gallic acid. *Braz. J. Microbiol.*, 2008, 39, 708–711. doi: 10.1590/S1517-838220080004000021
7. Murugan K., Al-Sohaibani S.A. Biocompatible removal of tannin and associated color from tannery effluent using the biomass and tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) enzymes of mango industry solid waste isolate *Aspergillus candidus* MTTC 9628. *Res. J. Microbiol.*, 2010, 5, 262–271. doi: 10.3923/jm.2010.262.271
8. Bhoite R.N., Murthy P.S. Biodegradation of coffee pulp tannin by *Penicillium verrucosum* for production of tannase, statistical optimization and its application. *Food Bioprod. Process.*, 2015, 94, 727–735. doi:10.1016/J.FBP.2014.10.007
9. Thomas R.L., Murtagh K. Characterization of tannase activity on tea extracts. *J. Food Sci.*, 2006, 50, 1126–1129. doi: 10.1111/j.1365-2621.1985.tb13026.x
10. Nie G., Zheng Z., Gong G., et al. Characterization of bioimprinted tannase and its kinetic and thermodynamics properties in synthesis of propyl gallate by transesterification in anhydrous medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2012, 167, 2305–2317. doi: 10.1007/s12010-012-9775-8
11. Белоус Е., Малтабар С.А., Галимова А.З. Композиция для ухода за полостью рта. Патент RU 2416391, Оpubл. 20.04.2011, Бюл. № 11.
12. Dhiman S., Mukherjee G., Singh A.K. Recent trends and advancements in microbial tannase-catalyzed biotransformation of tannins: a review. *Int. Microbiol.*, 2018, 21, 175–195. doi: 10.1007/s10123-018-0027-9
13. Сеницын А.П., Сеницына О.А., Рожкова А.М. Получение промышленно важных ферментов на основе экспрессионной системы грибов *Penicillium verruculosum*. *Биотехнология*, 2020, 36, 24–41. doi: 10.31857/S0320972520060093
14. Чекушина А.В. Целлюлолитические ферментные препараты на основе грибов *Trichoderma*, *Penicillium* и *Myceliophthora* с увеличенной гидролитической активностью. Автореф. дисс., канд. хим. наук, Московский государственный университет, 2013.
15. Aslanidis C., de Jong P.J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18, 6069–6074. doi: 10.1093/nar/18.20.6069
16. Sambrook J., Russell D.W. Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2006(1), pdb.prot3932. doi: 10.1101/pdb.prot3932
17. Penttilä M., Nevalainen H., Rättö M., et al. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 1987, 61, 155–164. doi: 10.1016/0378-1119(87)90110-7
18. Sharma S., Bhat T.K., Dawra R.K. A spectrophotometric method for assay of tannase using Rhodanine. *Anal. Biochem.*, 2000, 279, 85–89. doi:10.1006/ABIO.1999.4405
19. Lowry O.H., Rosebrough N.J.; Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265–275
20. James P. Proteome Research: Mass Spectrometry. Springer Verlag, Heidelberg, 2001.
21. Hagerman A.E., Butler L.G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J. Agric. Food Chem.*, 1978, 26, 809–812. doi: 10.1021/jf60218a027
22. Batra A., Saxena R.K. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *Process Biochem.*, 2005, 40, 1553–1557. doi: 10.1016/j.procbio.2004.03.003
23. Iibuchi S., Minoda Y., Yamada K. Hydrolyzing pathway, substrate specificity and inhibition of tannin acyl hydrolase of *Asp. oryzae* No. 7. *Agric. Biol. Chem.*, 1972, 36, 1553–1562. doi: 10.1080/00021369.1972.10860437
24. Короткова О.Г., Рубцова Е.А., Шашков И.А. и др. Сравнительный анализ состава и свойств кормовых ферментных препаратов. *Катализ в промышленности*, 2018, 18, 72–78. <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2018-4-72-78>
25. Tomás-Cortázar J., Plaza-Vinuesa L., de las Rivas B., et al. Identification of a highly active tannase enzyme from the oral pathogen *Fusobacterium nucleatum* subsp. polymorphum. *Microb. Cell Fact.*, 2018, 17, 33. doi: 10.1186/s12934-018-0880-4
26. Hatamoto O., Watarai T., Kikuchi M., et al. Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*. *Gene*, 1996, 175, 215–221. doi: 10.1016/0378-1119(96)00153-9
27. Farias G.M., Gorbea C., Elkins J.R., Griffin G.J. Purification, characterization, and substrate relationships of the tannase from *Cryphonectria parasitica*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 1994, 44, 51–63. doi: 10.1016/S0885-5765(05)80094-3
28. Barthomeuf C., Regeat F., Pourrat H. Production, purification and characterization of a tannase from *Aspergillus niger* LCF 8. *J. Ferment. Bioeng.*, 1994, 77, 320–323. doi: 10.1016/0922-338X(94)90242-9
29. Sharma S., Bhat T.K., Dawra R.K. Isolation, purification and properties of tannase from *Aspergillus niger* van Tieghem. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 15, 673–677. doi: 10.1023/A:1008939816281
30. Ramírez-Coronel M.A., Viniegra-González G., Darvill A., Augur C. A novel tannase from *Aspergillus niger* with β -glucosidase activity. *Microbiology*, 2003, 149, 2941–2946. doi: 10.1099/mic.0.26346-0
31. Gonçalves H.B., Riul A.J., Terenzi H.F., et al. Extracellular tannase from *Emericella nidulans* showing hypertolerance to temperature and organic solvents. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2011, 71, 29–35. doi: 10.1016/J.MOLCATB.2011.03.005

32. Riul A.J., Gonçalves H.B., Jorge J.A., Guimarães L.H.S. Characterization of a glucose- and solvent-tolerant extracellular tannase from *Aspergillus phoenicis*. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2013, 85–86, 126–133. doi: 10.1016/J.MOLCATB.2012.09.001
33. Aharwar A., Parihar D.K. *Talaromyces verruculosus* tannase production, characterization and application in fruit juices detannification. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 2019, 18, 101014. doi: 10.1016/J.BCAB.2019.01.052
34. Mondal K.C., Banerjee D., Banerjee R., Pati B.R. Production and characterization of tannase from *Bacillus cereus* KBR9. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2001, 47, 263–267. doi: 10.2323/jgam.47.263
35. Banerjee D., Mahapatra M., Bikas P.R. Gallic acid production by submerged fermentation of *Aspergillus aculeatus* DBF9. *J. Basic Microbiol.*, 2001, 6, 313–318. doi: 10.3923/jm.2007.462.468
36. Jana A., Maity C., Halder S.K., et al. Structural characterization of thermostable, solvent tolerant, cytosafe tannase from *Bacillus subtilis* PAB2. *Biochem. Eng. J.*, 2013, 77, 161–170. doi: 10.1016/J.BEJ.2013.06.002
37. Abdel-Naby M.A., El-Tanash A.B., Sherief A.D.A. Structural characterization, catalytic, kinetic and thermodynamic properties of *Aspergillus oryzae* tannase. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, 92, 803–811. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2016.06.098
38. Shao Y., Zhang Y.-H., Zhang F., et al. Thermostable tannase from *Aspergillus Niger* and its application in the enzymatic extraction of green tea. *Molecules*, 2020, 25, 952. doi: 10.3390/molecules25040952
39. Kumar C.S., Subramanian R., Rao L.J. Application of enzymes in the production of RTD black tea beverages: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2013, 53, 180–197. doi: 10.1080/10408398.2010.520098
40. Madeira J.V., Macedo J.A., Macedo G.A. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tannase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. *Bioresour. Technol.*, 2011, 102, 7343–7348. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2011.04.099
41. Jansman A.J.M. Tannins in feedstuffs for simple-stomached animals. *Nutr. Res. Rev.*, 1993, 6, 209–236. doi:10.1079/NRR19930013

Cloning, Isolation, and Properties of a New Recombinant Tannase from the *Aspergillus niger* Fungus

D.O. OSIPOV^{1*}, V.Yu. MATYS², V.A. NEMASHKALOV², A.M. ROZHKOVA¹, I.A. SHASHKOV¹, A.D. SATRUTDINOV¹, E.G. KONDRATYEVA¹, and A.P. SINITSYN^{1,3}

¹ *Fundamentals of Biotechnology Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071, Russia*

² *Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290, Russia*

³ *Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia*

*e-mail: doosipov@gmail.com

Received May 20, 2021

Revised July 20, 2021

Accepted July 22, 2021

Abstract—A new recombinant *Aspergillus niger* tannase (tannin acyl hydrolase) produced by the *Penicillium verruculosum* fungus has been studied. A strain with a high level of extracellular tannase (TAN2) secretion (80% of the total extracellular protein) was obtained by cloning the *tan2* gene (PDB Acc. No: MT828303) into the recipient strain. The tannase enzyme preparation degraded tannins in black tea extracts. TAN2 was isolated in homogeneous form using chromatographic methods; the enzyme had a high activity against gallotannin (53 U/mg) and less activity against propyl gallate (4.7 U/mg). Homogeneous TAN2 showed temperature and pH optima of 45 °C and 3.5, respectively. At a temperature of 50 °C, TAN2 retained above 80% activity for 3 h; at 60 °C, it retained about 75% of its activity for 90 min; at 70 °C, the enzyme was completely inactivated within 10 min. Tannase was characterized by a high tolerance to NaCl, the activity against gallotannin exceeded 50% of the initial value in solutions with a salt concentration of up to 5 M. The tannase activity was stimulated by Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ by 3–64% and inhibited by 4–65% in the presence of Co²⁺, Fe³⁺ and Fe²⁺ ions.

Key words: tannase, tannins, *Aspergillus niger*, *Penicillium verruculosum*

Funding—This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-6-25-33