

УДК 579.66

Сравнительный анализ эффективности экспрессии генов бактериальных фитаз в дрожжах *Pichia pastoris* с помощью чашечного теста

© 2017 Т.Л. ГОРДЕЕВА^{1,*}, Л.Н. БОРЩЕВСКАЯ¹, А.Н. КАЛИНИНА¹, С.П. СИНЕОКИЙ¹, С.П. ВОРОНИН², М.Д. КАШИРСКАЯ².

¹ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский Институт» – ГосНИИгенетика), Москва, 117545

²АО «Биоамид», Саратов, 410033

e-mail: tatiana.gordeeva@mail.ru*

Поступила 24.10.2017 г.

Принята в печать 13.11.2017 г.

Проведен сравнительный анализ эффективности экспрессии генов фитаз из *Escherichia coli*, *Obessumbacterium proteus* и *Citrobacter freundii* в клетках метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. Для выявления уровня экспрессии впервые предложена простая модельная система с использованием генетической конструкции на основе вектора рPIC9á и чашечного теста с модифицированной диагностической средой, содержащей метанол вместо глюкозы и фитат кальция. Оптимальный pH для активности фитаз обеспечивали добавлением молочной кислоты. Показано, что среди исследуемых гетерологичных генов наилучшей экспрессией характеризуется ген, кодирующий фитазу из *C. freundii*.

Ключевые слова: фитаза, дрожжи *Pichia pastoris*, чашечный тест.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-83-88

Для улучшения питательных свойств растительных кормов в сельском хозяйстве широкое распространение получили фитазы микробного происхождения, ферменты катализирующие гидролиз фитатов (миоинозитгексакисфосфатов) с отщеплением неорганического фосфата.

Фитаты у растений – это вещества, в виде которых они запасают фосфор; эти соединения практически не усваиваются организмом животных с однокамерным желудком и домашней птицы. Кроме того, фитаты являются хелатирующими агентами, снижающими пищевую ценность кормов. Введение фитаз в растительные корма повышает усвоение фосфора, кальция, микроэлементов, белков и аминокислот желудочно-кишечным трактом животных.

В настоящее время фитазы для сельскохозяйственных нужд производятся микробиологическим способом с использованием в основном рекомбинантных дрожжевых продуцентов. По-

требность промышленности в эффективных продуцентах постоянно возрастает [1]. Наиболее часто для высокоэффективной продукции гетерологичных белков используются метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* [2], так как инструментарий для манипуляций с генетическим материалом данного вида дрожжей хорошо разработан. Кроме того, штаммы *Pichia pastoris* способны наращивать биомассу высокой плотности и продуцировать рекомбинантные белки в концентрации до нескольких десятков граммов в 1 л КЖ.

Природными продуцентами фитаз являются грибы и бактерии; только некоторые из этих ферментов могут эффективно продуцироваться в клетках рекомбинантных дрожжей *Pichia pastoris*. Так, продуктивность трансформантов этих дрожжей, несущих ген *appA*, который кодирует фитазу *Escherichia coli*, составляет при ферментации в колбах от 118 до 204 ед/мл [3]. Продуктивность трансформантов

Список сокращений: КЖ – культуральная жидкость; пн – пар нуклеотидов; среда LB – среда Луриа–Бертани.

Pichia pastoris, экспрессирующих фитазу *Citrobacter amalonaticus*, при ферментации в колбах равна 420 ед/мл [4].

Таким образом, создание рекомбинантных дрожжевых штаммов-продуцентов фитаз требует поиска генов бактериальных ферментов, способных к эффективной экспрессии в клетках дрожжей.

Обычно сравнение различных бактериальных фитаз в единой экспрессионной системе является трудоемким процессом, включающим отбор однокопийных трансформантов и культивирование их в жидкой среде и затем измерение фитазной активности в КЖ одним из модифицированных методов Фиске-Суббароу.

Для оптимизации отбора наиболее продуктивных штаммов, секретирующих фитазы, целесообразно упростить процесс исследования путем применения менее сложных тестов.

Чашечный тест широко используется при скрининге микроорганизмов, продуцирующих различные ферменты, в том числе фитазы [5–8]. Он основан на гидролизе фитазами нерастворимого в среде фитата кальция и, как следствие, образовании зон осветления вокруг колоний. Хотя чашечный тест не является количественным, он позволяет отбирать наиболее продуктивные микроорганизмы по диаметру зоны осветления. Однако в литературе не описано использование данных подходов для оценки экспрессии генов, кодирующих фитазы, в клетках рекомбинантных дрожжевых штаммов.

Целью данной работы было сравнение эффективности экспрессии генов различных бактериальных фитаз в клетках дрожжей *Pichia pastoris* с использованием быстрого и удобного чашечного теста.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Реактивы

Триптон, пептон, дрожжевой экстракт, глюкоза и агар были получены от компании «Диа-М» (Россия); ферменты для молекулярных работ – от фирмы Fermentas (Литва); соли и другие реагенты (все реактивы марки «х.ч.» или «ч.д.а.») – от фирмы «Химмед» (Россия).

Штаммы и среды

Для стандартных генно-инженерных работ (конструирование плазмид, получение плазмидной ДНК) использовали штамм *E. coli* XL-1 Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqΔM15 Tn10 (Tet^r)*]) (ВКПМ В-5667). Культуру растили при 37 °С в среде LB,

содержащей, г/л: триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 5. В среду добавляли также ампициллин (Sigma, США) в концентрации 100 мкг/мл.

Штамм *Pichia pastoris* GS115 ВКПМ Y-2837 (*his4⁻*) был получен из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Культуру дрожжей *Pichia pastoris* растили при 30 °С на среде YPD следующего состава, г/л: пептон – 20; дрожжевой экстракт – 15; глюкоза – 20. Все плотные среды содержали агар в концентрации 20 г/л.

Для отбора трансформантов *P. pastoris* использовали минимальную среду M9 содержащую следующие компоненты, г/л: Na₂HPO₄ – 6; KH₂PO₄ – 3; NaCl – 0,5; NH₄Cl – 1; MgSO₄·7H₂O – 0,65; CaCl₂ – 0,111; агар – 20; глюкоза – 20, а также витамины и микроэлементы.

Определение фитазной активности штаммов проводили на диагностической среде следующего состава, г/л: Na₂HPO₄ – 6; KH₂PO₄ – 3; NaCl – 0,5; NH₄Cl – 1; MgSO₄·7H₂O – 0,65; агар – 20. Среду стерилизовали при 0,8 атм., охлаждали до 50 °С и вносили в нее стандартный раствор витаминов и микроэлементов [9]. После этого среду помещали в стерильные пробирки, в которые добавляли раствор фитата натрия (стерилизованный фильтрованием) до концентрации 0,75%, и перемешивали. Затем вносили молочную кислоту (89%) до концентрации 0,15% (об.), перемешивали и добавляли стерильный раствор 1 М CaCl₂ до концентрации 5% (об.). Образовавшийся белый осадок нерастворимого фитата кальция перемешивали до однородного состояния. Немедленно в смесь добавляли метанол до концентрации 1,5% (об.), перемешивали и помещали на чашки. Трансформанты дрожжей высевали штрихом и растили при 30 °С в течение 24 ч. Наличие фитазной активности определяли по появлению зон осветления вокруг клеток культуры.

В качестве источников генов фитаз использовали ДНК штаммов, депонированных в ВКПМ: *Escherichia coli* XL-1 Blue, *Obesumbacterium proteus* В-6898 и *Citrobacter freundii* В-4090.

Конструирование экспрессионных интеграционных плазмид и рекомбинантных штаммов *P. pastoris*

Для конструирования плазмид использовали вектор pPIC9α (Invitrogen). Синтез генов, кодирующих фитазы, проводили методом ПЦР с применением праймеров (табл.1), синтезированных фирмой «Евроген» (Москва). В качестве матрицы использовали ДНК бактериальных штаммов. Выделение хромосомной ДНК проводили с помощью комплекта реагентов для экспресс-выделения

Праймеры, использованные для клонирования гена фитазы из различных источников**Primers used for cloning of gene for phytase from various sources**

Название	Последовательность (5'→3')	Источник фитаз
PhyC-F PhyC-R	aagaattcgaagagcagaacggatga agcggccgcttactattccgtaactg	<i>C. freundii</i>
PhyO-F PhyO-R	aagaattcagtgaaaccgaacctccgga agcggccgcttattggcactccaccagttcgt	<i>O. proteus</i>
PhyE-F PhyE-R	aagaattccagagtgagccggagctgaagct agcggccgcttacaactgcacgccggt	<i>E. coli</i>

ДНК «ДНК–экспресс» («Синтол», Россия). ПЦР-продукты выделяли и очищали с использованием набора GeneJET Gel Extractin Kit #KO692 (Fermentas, Литва). Все стандартные генно-инженерные манипуляции (обработка ДНК ферментами, трансформация *E. coli*) проводили в соответствии со сборником методик [10].

Полученные рекомбинантные плазмиды расщепляли эндонуклеазой рестрикции *Bgl*II и использовали для трансформации клеток *P. pastoris* согласно протоколу Kit #28662 (Invitrogen). Трансформанты дрожжей отбирали по способности расти на минимальной среде M9 без источника гистидина.

Культивирование рекомбинантных штаммов *P. pastoris*

Для получения инокулята штаммы выращивали в жидкой питательной среде YPD с добавлением 20 г/л глюкозы в течение 24 ч. Затем полученной культурой в соотношении 1:10 инокулировали среду YPD, содержащую 10 г/л глюкозы, и клетки 24 ч выращивали в пробирках при 30 °С. Далее в течение пяти дней добавляли в культуру метанол в количестве 1% в сутки. Поле этого отбирали аликвоту культуры, клетки осаждали центрифугированием, а супернатант анализировали на наличие фитазной активности.

Определение фитазной активности

Активность фитаз определяли по накоплению в реакционной смеси свободного фосфат-иона с помощью модифицированного метода Фиске-Субарроу [3]. Супернатант (см. предыдущий раздел) (100 мкл) инкубировали с 900 мкл раствора субстрата (2%-ный фитат натрия в 0,1 М ацетатном буфере, pH 4,0) при 37 °С в течение 30 мин. Количество освобожденного неорганического фосфата анализировали, добавляя 1 мл красящего реагента (свежеприготовленной смеси, состоящей из 4 объемов 1,5%-ного раствора молибдата

аммония в 5,5% (об.) серной кислоте и 1 объема 2,5%-ного водного раствора сульфата железа (II)). Затем оптическую плотность раствора при 700 нм измеряли на спектрофотометре Versamax reader (Molecular Devices, Sunnyvale, США). За единицу фитазной активности принимали количество фермента, способного высвободить 1 мкмоль неорганического фосфата из фитата натрия за 1 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для тестирования уровня экспрессии генов бактериальных фитаз, интегрированных в хромосому клеток дрожжей *Pichia pastoris*, был предложен быстрый в исполнении и простой способ. Гены бактериальных фитаз (из *E. coli*, *O. proteus* и *C. freundii*) клонировали в составе интеграционного экспрессионного вектора pPIC9 α под контролем сильного промотора AOX1, индуцируемого метанолом. Данная экспрессионная система наиболее востребована для промышленного получения ферментов [11]. Продуктивность трансформантов *P. pastoris* оценивали с помощью чашечного теста.

Клонирование генов, кодирующих бактериальные фитазы из *E. coli*, *O. proteus* и *C. freundii* в составе экспрессионного вектора pPIC9 α

Методом ПЦР с использованием праймеров (см. табл. 1) и ДНК *E. coli*, *O. proteus* и *C. freundii* в качестве матрицы были синтезированы фрагменты ДНК, содержащие кодирующую область генов фитаз из указанных бактерий. Для получения экспрессионных плазмид амплифицированные фрагменты ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Eco*RI и *Not*I и затем лигировали с ДНК аналогично расщепленного экспрессионного вектора pPIC9 α . Полученными плазмидами трансформировали клетки *E. coli*. Трансформанты отбирали по устойчивости к ампициллину. Плазмидную ДНК,

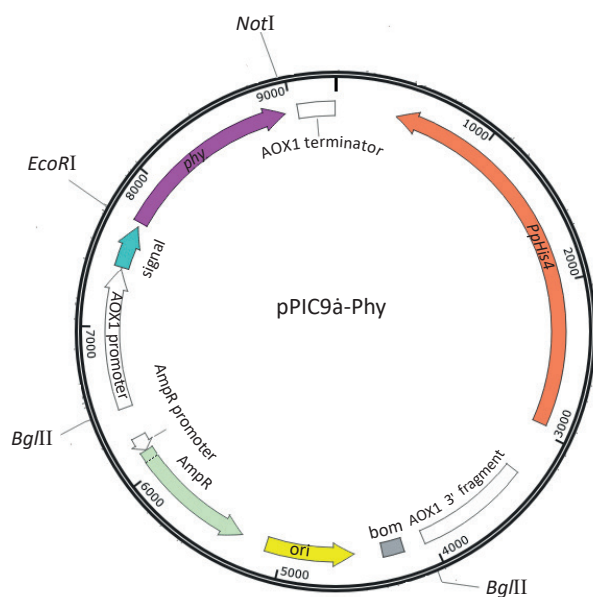


Рис. 1. Схематическое изображение экспрессионной плазмиды pPIC9 α -Phy, содержащей ген бактериальной фитазы (*phy*)

Fig. 1. Scheme of expression plasmid pPIC9 α -Phy that contains a gene for bacterial phytase (*phy*)

выделенную из отобранных клонов, идентифицировали с помощью рестрикционного анализа (рис. 1).

Экспрессионные плазмиды обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *Bgl*III и получали экспрессионные кассеты, содержащие в своем составе плечи для интеграции, ген фитазы под контролем индуцибельного промотора AOX1, сигнальный пептид, представляющий собой препро-последовательность α -фактора дрожжей *S. cerevisiae*, и селективный маркер *His4*. Эта последовательность используется для эффективной секреции большинства гетерологичных белков, синтезируемых в клетках *P. pastoris*.

Получение рекомбинантных штаммов *P. pastoris*

Экспрессионными кассетами трансформировали клетки дрожжей *P. pastoris* согласно протоколу [12]. Трансформанты отбирали по способности расти на минимальной среде М9 без добавления гистидина. Из общего числа трансформантов произвольно отбирали по пять трансформантов, полученных при использовании одной из экспрессионных кассет, и проверяли их на наличие целевого гена в составе хромосомной ДНК методом ПЦР (данные не приведены) с использованием праймеров, приведенных в табл. 1.

После подтверждения наличия ПЦР-фрагментов ожидаемого размера (для фитазы из *C. freundii* – 1236 пн; из *O. proteus* – 1236 пн; из *E. coli* – 1263 пн) в составе хромосомы полученных трансформан-

тов отобранные штаммы *P. pastoris* тестировали на способность продуцировать и секретировать фитазу в КЖ с использованием чашечного теста.

Сравнение эффективности экспрессии генов фитаз в чашечном тесте

В ходе данного исследования был разработан чашечный тест для быстрого отбора среди метилотрофных дрожжей *P. pastoris* наиболее активных продуцентов секретируемых бактериальных фитаз. Тест основан на гидролизе фитазами нерастворимого фитата кальция, приводящем к образованию зон осветления вокруг растущих колоний.

Подобный тест широко используется для скрининга бактерий и грибов, способных к синтезу фитаз; однако ранее его не применяли в отношении метилотрофных дрожжей. Мы внесли в этот тест существенные модификации, которые позволили использовать его и при анализе секретируемой фитазной активности у рекомбинантных дрожжей.

Прежде всего, была проведена модификация состава диагностической среды. Обычно при скрининге бактериальных и грибных штаммов в качестве единственного источника углерода в среду добавляют глюкозу [13]. Следует отметить, что глюкоза метаболизируется с выделением в среду кислот, которые, как и фитазы, растворяют фитат кальция с образованием зон осветления, что может привести к неправильной интерпретации результатов теста [14]. Кроме того, глюкоза является ингибитором промотора AOX1, используемого в экспрессионной системе *P. pastoris* [2].

Известно, что метилотрофные дрожжи в качестве единственного источника углерода могут использовать метанол, при метаболизме которого не происходит выделения кислот. Кроме того, метанол индуцирует экспрессию генов, регулируемых промотором AOX1. Поэтому глюкоза в ростовой среде была заменена на метанол.

Бактериальные фитазы относятся к классу кислых гистициновых фосфатаз и оптимальные значения pH для их работы находятся в кислой области. pH обычных ростовых сред близки к нейтральным значениям [15], при которых фитазы почти неактивны. Для снижения pH ростовой среды мы использовали молочную кислоту.

Таким образом, разработанный в ходе данной работы чашечный тест отличается подбором оптимального источника углерода и оптимальной кислотности диагностической среды.

На чашку с диагностической средой высевали по 5 трансформантов дрожжей *P. pastoris*, продуцирующих фитазу одной из бактерий – *E. coli*,

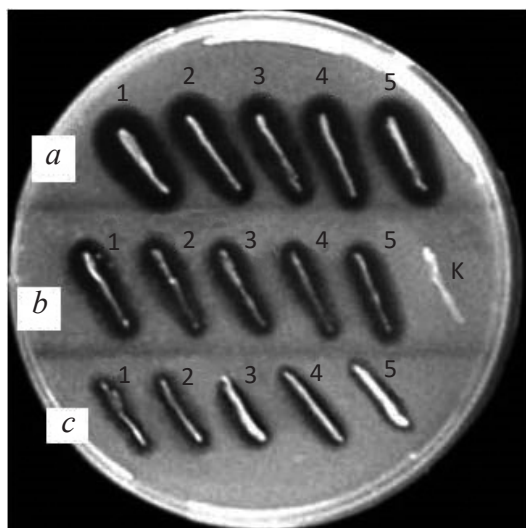


Рис. 2. Образование зон осветления при росте на чашке с диагностической средой трансформантов *P. pastoris*, несущих гены фитаз из следующих бактерий: *a* – *C. freundii*; *b* – *E. coli*; *c* – *O. roteus*. К – контроль (исходный штамм *P. pastoris*). Номера 1–5 соответствуют номерам штаммов в табл. 2

Fig. 2. Formation of clarified zones during plate growth on diagnostic medium of *P. pastoris* bearing phytase genes from the following bacteria: *a*, *C. freundii*; *b*, *E. coli*; and *c*, *O. proteus*. K, control (original *P. pastoris* strain). Numbers 1–5 are in consent with strain numbers in Table 2

O. proteus или *C. freundii*. После 24 ч культивирования при 30 °С оценивали площадь зон осветления вокруг каждой растущей культуры (рис. 2).

Как видно из рис. 2, наибольшая площадь зоны осветления наблюдалась у трансформантов, содержащих ген фитазы из *C. freundii*. Зона осветления вокруг трансформантов, экспрессирующих ген фитазы из *E. coli*, была меньшей площади, а в случае фитазы из *O. proteus* – вовсе незначительной. Исходя из величины зоны гидролиза фитата кальция, был сделан вывод, что наиболее эффективно в дрожжах *P. pastoris* экспрессируется ген,

кодирующий фитазу из *C. freundii*. Наименьшую активность проявляют трансформанты, несущие ген, кодирующий фитазу из *O. proteus*.

Для проверки выводов, сделанных на основе чашечного теста, было проведено прямое количественное измерение активности трех бактериальных фитаз в рекомбинантных штаммах *P. pastoris* модифицированным методом Фиске-Субарроу [14]. Для этого штаммы выращивали на жидкой среде YPD с 1% глюкозы в течение 24 ч, затем индуцировали экспрессию генов фитаз путем добавления 2%-ного метанола каждые 24 ч в течение 5 сут. После этого клетки осаждали центрифугированием и фитазную активность анализировали в супернатанте. Результаты анализа представлены в табл. 2.

Как видно из данных табл. 2, наибольшей продуктивностью обладают трансформанты, несущие ген, кодирующий фитазу из *C. freundii*, а наименьшей – трансформанты, несущие ген фитазы из *O. proteus*, что подтверждает данные, полученные в чашечном тесте.

Таким образом, предложенный способ оценки активности фитаз (простой и удобный чашечный тест + оптимальная диагностическая среда) позволяет проводить сравнительный анализ уровня экспрессии соответствующих генов у метилотрофных дрожжей, а также быстрый скрининг трансформантов *P. pastoris*, продуцирующих бактериальные фитазы.

Данный подход может быть использован для оценки активности дрожжевых культур при конструировании штаммов – продуцентов фитаз промышленного значения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта - RFMEFI57917X0145) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов».

Таблица 2

Продуктивность трансформантов *P. pastoris*, несущих гены бактериальных фитаз

Productivity of *P. pastoris* transformants bearing genes for bacterial phytases

Номер дрожжевого трансформанта	Продуктивность трансформанта, ед/мл, несущего ген фитазы из		
	<i>C. freundii</i>	<i>E. coli</i>	<i>O. proteus</i>
1	663	479	117
2	624	432	135
3	592	440	106
4	615	411	124
5	635	451	59

ЛИТЕРАТУРА

- Hosseinkhani B., Emtiazi G., Nahvi I. Analysis of phytase producing bacteria (*Pseudomonas* sp.) from poultry faeces and optimization of this enzyme production. *Afr. J. Biotechnol.*, 2009, 8(17), 4229–4232.
- Daly R., Hearn M.T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.*, 2005, 18(2), 119–138. doi: 10.1002/jmr.687
- Chen C.C., Wu P.H., Huang C.T., et al. A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase. *Enzyme Microb. Technol.*, 2004, 35(4), 315–320. doi: 10.1016/j.enzmictec.2004.05.007
- Luo H., Huang H., Yang P., et al. A novel phytase appA from *Citrobacter amalonaticus* CGMCC 1696: gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. *Curr. Microbiol.*, 2007, 55(3), 185–192. doi: 10.1007/s00284-006-0586-4
- Rodrigues H., Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.*, 1999, 17, 319–339.
- Chunshan Q., Linghua Z., Yunji W., et al. Production of phytase in slow phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. *J. Biosci. Bioeng.*, 2001, 92, 154–160.
- Dhiraj K., Subramani R., Pannerselvam B., et al. Screening, optimization and application of extracellular phytase from *Bacillus Megaterium* isolated from poultry waste. *J. Mod. Biotechnol.*, 2013, 2(2), 46–52.
- Sreedevi S., Reddy B.N. Screening for efficient phytase producing bacterial strains from different soils. *IJB*, 2013, 3(1), 76–85.
- Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификации дрожжей. М.: Пищевая промышленность, 1979, 254.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. N.Y., CSHL, 1989, 4–1626.
- Macauley-Patrick S., Fazenda M.L., McNeil B., et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, 22, 249–270.
- Shixuan W., G.J. Letchworth. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BioTechniques*, 2004, 36, 152–154.
- Marlida Y., Delfita R., Gusmanizar N., et al. Identification characterization and production of phytase from endophytic fungi. *IJIRSE*, 2010, 4(5), 360–363.
- Bae L.J., Yanke K.J., Cheng H.D., et al. A novel staining method for detecting phytase activity. *J. Microbiol. Methods*, 1999, 39(1), 17–22. doi: 10.1016/S0167-7012(99)00096-2
- Chunshan Q., Linghua Z., Yunji W., et al. Production of phytase in slow phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. *J. Biosci. Bioeng.*, 2001, 92(2), 154–160. doi: 10.1016/S1389-1723(01)80217-6

Comparative Analysis in Plate Test of Expression Efficiency of Genes for Bacterial Phytases in *Pichia pastoris* yeast

T.L. GORDEEVA^{1*}, L.N. BORSHCHEVSKAYA¹, A.N. KALININA¹, S.P. SINEOKY¹, S.P. VORONIN² and M.D. KASHIRSKAYA²

¹The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Centre «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» – GosNIIgenetika), 117545, Moscow Russia

²Bioamid, JSC, 410033, Saratov Russia

e-mail: tatiana.gordeeva@mail.ru*

Received: October 24, 2017

Accepted: November 13, 2017

Abstract—A comparative analysis of the efficiency of the *Escherichia coli*, *Obessumbacterium proteus* and *Citrobacter freundii* phytase gene expression in a *Pichia pastoris* methylotrophic yeast has been carried out. The level of the expression was assessed using a suggested for the first time simple model using a genetic construct based on the pPIC α vector and a plate test with a modified diagnostic medium containing methanol instead of glucose and calcium phytate. The optimum pH value for the phytase reaction was provided by the addition of lactic acid. It was shown that the gene for the *C. freundii* phytase manifested the best expression among the studied heterologous genes.

Key words: phytase, *Pichia pastoris*, plate test.

Acknowledgements—The work was financially supported by the Ministry of Education and Science of RF (Project Unique Identifier RFMEFI57917X0145) and used the help of the National Bioresource Center All-Russian Collection of Industrial Microorganisms (Moscow, Russia).

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-83-88