

## Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 579.66

### Экспрессия и характеристика фитазы из *Obesumbacterium proteus* в дрожжах *Pichia pastoris*

© 2018 Т.Л. ГОРДЕЕВА<sup>1,\*</sup>, Л.Н. БОРЩЕВСКАЯ<sup>1</sup>, А.Н. КАЛИНИНА<sup>1</sup>, С.П. СИНЕОКИЙ<sup>1</sup>,  
С.П. ВОРОНИН<sup>2</sup>, М.Д. КАШИРСКАЯ<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>АО «Биоамид», 410033 Саратов

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

Поступила: 24.05.2018 г.

Принята в печать: 06.07.2018 г.

Для увеличения уровня экспрессии рекомбинантных фитаз в дрожжах *Pichia pastoris* была разработана оптимизированная по кодоновому составу синтетическая последовательность гена *phyOp-mod*, кодирующая фитазу из *Obesumbacterium proteus*. Содержание нуклеотидов G и C было скорректировано до 48,33%, AT-богатые участки устранены. Для очищенного фермента были определены основные характеристики. Оптимальными для работы фитазы PhyOp являются значения: pH 4,0 и температура 50 °C. Значения удельной активности, константы Михаэлиса (*K<sub>m</sub>*) и максимальной скорости реакции (*V<sub>max</sub>*) в отношении фитата натрия составили 1452 ед/мг, 0,31 мМ и 823 ед/мг, соответственно. Показано, что оптимизация кодонового состава гена *phyOp-mod* привела к увеличению экспрессии целевого фермента. Благодаря относительно высокой удельной активности и кинетическим характеристикам рекомбинантная фитаза, обозначенная как PhyOp, потенциально пригодна для применения ее в качестве кормовой добавки.

**Ключевые слова:** фитаза *Obesumbacterium proteus*, *Pichia pastoris*, оптимизация кодонов.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-4-18-25

Фосфор является важным минеральным питательным веществом для роста и развития животных. В большинстве источников сырья, используемого в животноводстве, такого как зерновые и бобовые, фитат (мио-инозитол гексакисфосфат) является основной формой хранения фосфора [1]. Однако такие животные, как свиньи, бройлеры, индейки не способны усваивать фитатный фосфор из-за отсутствия необходимого фермента в пищеварительном тракте [2]. Фитаты являются хелатирующими агентами и препятствуют эффективному усвоению кальция, магния, цинка, железа и других минеральных веществ, а также связывают белки в недоступные для переваривания комплексы [3].

Ферменты фитазы (мио-инозитол гексакисфосфат-фосфогидролазы) гидролизуют фитат с отщеплением фосфатных групп и успешно используются в качестве кормовой добавки, значительно повышая усвоение фосфора [4, 5]. Они обеспечивают высвобождение не только фитат-связанного фосфора, но также белков, макро- и микроэлементов, повышая переваримость и усвояемость кормов [6, 7]. Ферменты, входящие в состав добавок, постоянно меняются, так что предпочтение отдается фитазам с целевыми параметрами.

В настоящее время фитазы получают микробиологическим путем с использованием рекомбинантных штаммов-продуцентов. В частности, для этих целей широко используются метилотрофные

Список сокращений: SDS – лаурилсульфат натрия; SDS-ПААГ – белковый электрофорез в денатурирующих условиях, которые достигаются добавлением SDS.

дрожжи *Pichia pastoris*. Для них разработаны питательные среды и отработан процесс ферментации с использованием культуры высокой плотности. Кроме того, они обладают мощными системами экспрессии генов и секреции рекомбинантных белков, в том числе, фитаз. Начало синтеза целевого фермента в процессе ферментации строго регулируется с помощью добавления в ростовую среду индуктора – метанола. Такая схема ферментации позволяет получать большие концентрации целевого белка в культуральной жидкости.

Значительно повысить экспрессию гетерологичных белков позволяет получение синтетических последовательностей генов с оптимизированным кодоновым составом [8]. Так, в дрожжах *P. pastoris* экспрессировали оптимизированные синтетические гены, кодирующие фитазы из *Citrobacter amalonaticus* [9], *Escherichia coli* [10], *Peniophora lycii* [11], *Citrobacter braakii* [12], *Citrobacter freundii* [13, 14] и др.

Известно, что различные варианты оптимизации кодонового состава одного и того же гена приводят в результате к существенным различиям в уровне экспрессии этого гена. Так, экспрессия гена целлобиогидролазы 2 из *Trichoderma reesei*, представленного в двух вариантах последовательности нуклеотидов, различалась в 4 раза [15]. Кроме того, оптимизация кодонового состава генов белков помогает успешно экспрессировать те из них, которые в нативном состоянии в *Pichia pastoris* не удавалось экспрессировать [8].

В настоящей работе для экспрессии в дрожжах *Pichia pastoris* была выбрана фитаза бактерий *Obesumbacterium proteus* как обладающая свойствами для перспективного использования в промышленности [16]. Фитаза из бактерий *Obesumbacterium proteus* была впервые охарактеризована в нашей лаборатории [16]. Однако, в дрожжах *P. pastoris* ген указанной фитазы экспрессировал слабо [17] и рекомбинантный белок не был выделен и охарактеризован.

Цель данной работы – повысить экспрессию гена фитазы из бактерий *Obesumbacterium proteus* в дрожжах *P. pastoris* путем оптимизации кодонового состава данного гена и охарактеризовать полученный рекомбинантный белок.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Реактивы

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

### Штаммы и среды

Для стандартных генно-инженерных работ (конструирование плазмиды, наработка плазмидной ДНК) использовали штамм *E. coli* XL-1 Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]). Культуру растили при 37 °С в среде LB, г/л: триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 5; если было необходимо для получения трансформантов добавляли ампициллин (Sigma, США) в концентрации 100 мкг/мл.

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

Для отбора трансформантов *P. pastoris* использовали минимальную среду M9 следующего состава, г/л: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 3; NaCl – 0,5; NH<sub>4</sub>Cl – 1; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O – 0,65; CaCl<sub>2</sub> – 0,111; агар – 20; витамины; микроэлементы; глюкоза – 20. Состав витаминов и микроэлементов приведен в [18].

### Оптимизация последовательности гена фитазы

В качестве исходной нуклеотидной последовательности гена *phyOp*, кодирующего фитазу из *O. proteus*, использовали сиквенс, приведенный в международной базе данных GenBank под номером AY378096. Оптимизированная последовательность гена *phyOp-mod* была разработана согласно частотам встречаемости кодонов в дрожжах *P. pastoris* [19]. Для дизайна и анализа процентного содержания GC-пар и удаления AT-богатых областей полученной последовательности использовали программы <https://eu.idtdna.com/CodonOpt> и <https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis>. Полученная последовательность представлена в международной базе данных GenBank под MH553381. Гомологичное выравнивание аминокислотных и нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы BLAST [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>].

### Конструирование экспрессионной интеграционной плазмиды и рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris*

Для конструирования плазмиды использовали экспрессионный вектор pPIC9α [17], содержащий в своем составе индуцибельный промотор *AOX1*, сигнал секреции α-фактор дрожжей *S. cerevisiae*,

селективный маркер *HIS4*. Ген с оптимизированным нуклеотидным составом *phyOp-mod* синтезировали в НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика методом, описанным ранее [14]. На 5'- и 3'-концах нуклеотидной последовательности были предусмотрены сайты рестрикции *EcoRI* и *NotI* для клонирования в вектор pPC96. Экспресс-выделение хромосомной ДНК проводили с использованием комплекта реагентов «ДНК-экспресс» («Синтол», Россия). Выделение и очистку ПЦР продуктов проводили с использованием набора GeneJET Gel Extractin Kit #KO692 (Fermentas). Все стандартные генно-инженерные манипуляции (обработка ДНК ферментами, лигирование, трансформация клеток *E. coli*) проводились в соответствии с методиками [20].

Полученную рекомбинантную плазмиду расщепляли эндонуклеазой рестрикции *BglIII* и трансформировали в клетки *P. pastoris* согласно протоколу Kit #28662 (Invitrogen). Трансформанты отбирали по способности расти на минимальной среде M9 без источника гистидина. Наличие интеграционной кассеты в составе хромосомы трансформантов определяли методом ПЦР с использованием праймеров: *PhyOp-mod-F* (5'-tccgagacagagcctcag-3'), *PhyOp-mod-R* (5'-ttattgacactctaccagctca-3').

#### **Ферментация рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris***

Для получения инокулята штаммы выращивали в жидкой питательной среде YPD с добавлением 20 г/л глюкозы в течение 24 ч. Затем полученным инокулятом засеивали пробирки со средой YPD, содержащей 10 г/л глюкозы, в соотношении 1:10, и выращивали при 30 °С в течение 24 ч. Далее добавляли метанол в количестве 1% каждые сутки в течение 5 дней. Отбирали аликвоту, клетки осаждали центрифугированием, супернатант анализировали на наличие фитазной активности.

#### **Выделение и очистка фитазы**

Культуральную жидкость центрифугировали при g 14000 в течение 10 мин. Для осаждения примесных белков к супернатанту добавляли равный объем 0,5М глицин-HCl буфера (pH 1,8) и выдерживали при 37 °С в течение 30 мин. Образец центрифугировали при g 14000 в течение 10 мин, супернатант очищали от остатков соли и низкомолекулярных компонентов на установке Amicon (Merck, Германия) через мембрану с порогом отсека 30 кДа и разбавляли 10 мМ натрий ацетатным буфером pH 4,5. Полученный раствор наносили на катионообменную колонку HiTrap SP 5 мл (GE Healthcare, Швеция), предварительно уравновешенную

10 мМ натрий-ацетатным буфером pH 4,5. Элюцию осуществляли линейным градиентом хлорида натрия (от 0 до 1М) в том же буфере. Фракцию, вышедшую отдельным пиком и проявившую фитазную активность, собирали и анализировали методом SDS-ПААГ электрофореза с использованием 12%-ного полиакриламидного геля (камера для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN® Tetra фирмы Bio-Rad) с последующим окрашиванием реактивом Coomassie brilliant blue R-250.

Концентрацию очищенного белка определяли методом Бредфорд с помощью посредством набора фирмы «Диа-М» (Россия), согласно инструкции, и бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта («Диа-М»).

Теоретический расчет молекулярной массы белка и поиск сайтов для N-гликозилирования осуществляли посредством программ SnapGene (<http://www.snapgene.com/>) и NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

#### **Определение фитазной активности**

Фитазную активность определяли по накоплению в реакционной смеси свободного фосфат-иона, детектируемого модифицированным методом Фиске-Субарроу [21]. 100 мкл раствора фермента (супернатанта) инкубировали с 900 мкл раствора субстрата (2%-ный фитат натрия в 0,2 М ацетатном буфере), pH 4,0, при 37 °С в течение 30 мин. Количество освобожденного неорганического фосфата анализировали, добавляя 1000 мкл красящего реагента (свежеприготовленной смеси, состоящей из четырех объемов 1,5%-ного молибдата аммония в 5,5%-ной (об.) серной кислоты и 1 объема 2,5%-ного водного раствора сульфата железа (II)), и измеряя оптическую плотность раствора при 700 нм на спектрофотометре Versamax reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). За единицу фитазной активности принимали количество фермента, способного высвободить из фитата натрия 1 мкмоль/мин неорганического фосфата.

#### **Определение свойств и кинетических характеристик фитазы**

Для определения pH-профиля фермента использовали следующие 0,2 М буферные растворы: глицин-HCl (pH 2,0–3,5), Na-ацетатный (4,0–5,5) и трис-HCl (pH 6,0–8,0).

Для определения температурного оптимума ферментативная активность измерялась в интервале температур от 30 °С до 70 °С. Термостабильность определялась как остаточная активность после инкубации фермента при 80 °С в течение 10 мин. Влияние

ионов металлов ( $K^+$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Li^{2+}$ ) и других реагентов (SDS, ЭДТА) на ферментативную активность исследовали путем добавления указанных веществ в реакционную смесь до конечной концентрации 1 мМ. Кинетические параметры определялись согласно методу двойных обратных величин Лайнуивера-Берка. Реакцию проводили в 0,2 М ацетатном буфере, рН 4,0, при 37 °С в интервале времени от 2 до 15 мин, используя растворы фитата натрия с различной концентрацией от 0,125 до 5 мМ в качестве субстрата. Все эксперименты проводились независимо в трех повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Оптимизация последовательности гена фитазы

Оптимизация кодонов широко и успешно используется для улучшения уровня экспрессии гетерологичных белков в различных штаммах-хозяевах, в частности, благодаря предотвращению потенциального истощения тРНК [12, 22, 23]. Последовательность нативного гена фитазы была оптимизирована с учетом частот встречаемости кодонов у эффективно экспрессирующихся генов в дрожжах *P. pastoris* [19]. Кодоны, кодирующие 255 аминокислот, были оптимизированы путем замены 305 нуклеотидов, входящих в их состав. Для улучшения эффективности транскрипции гена фитазы содержание GC пар было снижено с 52,53 до 48,33% [8]. Для предотвращения преждевременной терминации транскрипции АТ-богатые участки были удалены путем использования вырожденных кодонов, включающих минимальное количество аденина и тиамина.

Полученная синтетическая последовательность *phyOp-mod* имела 76% гомологии с последовательностью нативного гена *phyOp* в соответствии с результатами гомологичного выравнивания сиквенсов в программе BLAST.

### Клонирование гена *phyOp-mod* в экспрессионный вектор

Ген *phyOp-mod* был клонирован в интегративный экспрессионный вектор рPIC9 $\alpha$  [17] под контролем индуцибельного промотора гена *AOX1*. Для секреции фермента в культуральную жидкость в векторе был предусмотрен сигнальный пептид, представляющий из себя пре-про-последовательность  $\alpha$ -фактора дрожжей *S. cerevisiae*. Была получена плазида рPIC9 $\alpha$ -PhyOp-mod. Рестрикционный анализ и секвенирование показали, что экспрессионная плазида сконструирована корректно (данные не приведены).

### Экспрессия гена фитазы в дрожжах *Pichia pastoris*

Различные варианты рекомбинации гетерологичного гена оказывают влияние на эффективность экспрессии в дрожжах *P. pastoris* [24]. Таким образом, положительные трансформанты определяли в процессе скрининга на уровень экспрессии с использованием чашечного теста [17]. Трансформанты выращивали на плотной селективной среде, содержащей фитат кальция, и для дальнейшей работы отбирали пять наиболее активных трансформантов.

Для изучения влияния оптимизации кодового состава на экспрессию гена проводили сравнение активности выбранных штаммов и наиболее активного штамма (контроль), несущего в составе хромосомы нативный ген фитазы, полученного нами ранее [17]. Как показали результаты ферментации, продуктивность полученных штаммов после индукции метанолом в течение 120 ч увеличилась в среднем на 52% по сравнению с контрольным штаммом. Штамм, показавший наибольшую продуктивность, составившую 214 ед/мл, был отобран для дальнейшей работы.

Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными. Так, оптимизация кодонов увеличила выход  $\beta$ -1,3-1,4-глюканазы из *Bacillus licheniformis* при экспрессии в дрожжах *P. pastoris* на 53,8% [8], а фитазы из *Citrobacter freundii* – на 50% [14]. Оптимизация гена фитазы из *Citrobacter freundii* позволила получить рекомбинантный штамм *P. pastoris* с активностью 193,2 ед/мл культуральной жидкости [13].

### Очистка рекомбинантного белка

Рекомбинантная фитаза PhyOp была очищена в два этапа. На первом этапе примесные белки осаждали путем подкисления культуральной жидкости до рН 2, что не оказывало влияния на фермент из-за его кислотоустойчивости. На втором этапе белок был очищен до электрофоретической однородности методом катионообменной хроматографии.

Проведение SDS-ПААГ электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле показало, что молекулярная масса очищенной рекомбинантной фитазы составляет приблизительно 45 кДа (рис. 1), что согласуется с теоретически рассчитанным значением 45,3 кДа.

Таким образом, фитаза PhyOp не является гликозилированным белком. В дрожжах *P. pastoris* белки могут подвергаться как N-, так и O-гликозилированию [13]. Однако, по расчетным

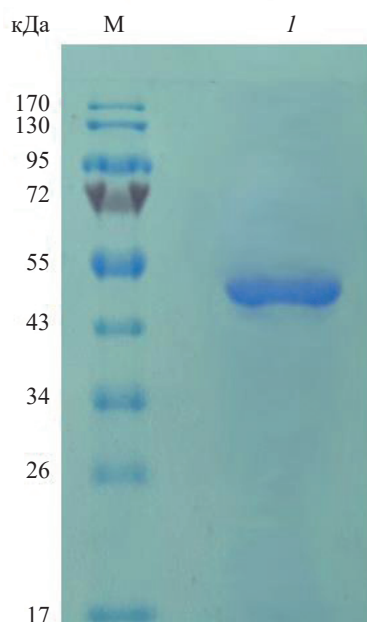
данным, сайты N-гликозилирования в аминокислотной последовательности фитазы *O. proteus* отсутствуют. Как показал SDS-ПААГ-электрофорез, молекулярная масса рекомбинантной фитазы соответствует расчетному значению, поэтому можно предположить, что O-гликозилирование в исследуемой фитазе также отсутствует.

### Свойства рекомбинантной фитазы

Удельная активность очищенного фермента PhyOp составила 1452 ед/мг белка, что значительно превышает значение удельной активности (310 ед/мг) для этого же фермента, экспрессированного в клетках *E. coli*. О таком различии для других ферментов сообщалось ранее в других исследованиях [13, 25]. Это явление может быть связано с различными посттрансляционными модификациями и особенностями фолдинга белков в различных организмах-хозяевах. Кроме того, на расчет величины удельной активности оказывает влияние степень чистоты анализируемого белка, которая, в свою очередь, зависит от выбранного аналитического метода [26].

Полученная удельная активность фермента PhyOp значительно выше, чем у применяющейся в промышленности фитазы из *Aspergillus niger* (100 ед/мг) [27], и сопоставима со значениями удельных активностей таких известных коммерческих ферментов, как фитазы из *E. coli* (1800 ед/мг) [28], *Peniophora lycii* (864 ед/мг) [11], *Citrobacter freundii* (2072 ед/мг) [13] и др.

Для рекомбинантной фитазы были вычислены кинетические параметры гидролиза фитата натрия согласно методу Лайнуивера–Берка. Значение константы Михаэлиса ( $K_m$ ) и максималь-



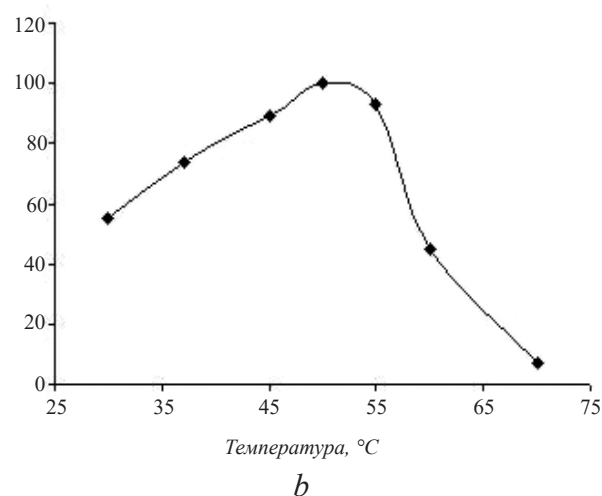
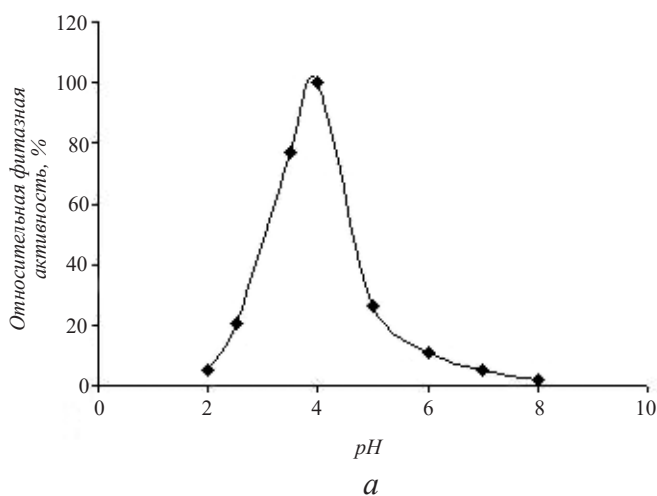
**Рис. 1.** SDS-ПААГ-электрофорез очищенной фитазы PhyOp. М – маркер молекулярной массы (Thermo Scientific), дорожка 1 – очищенная фитаза PhyOp

**Fig. 1.** SDS-PAGE of purified phytase PhyOp: M, MM marker (Thermo Scientific), lane 1, purified enzyme

ная скорость реакции ( $V_{max}$ ) составили 0,31 мМ и 823 ед/мг, соответственно.

Была изучена активность рекомбинантной фитазы при различных значениях pH и температуры, рис. 2а и 2б, соответственно.

Как видно из рис. 2а, оптимальное значение pH для работы фермента наблюдалось при значении 4,0. Надо отметить, что при экспрессии гена фитазы в клетках *E. coli* фермент имел два оптимальных значения pH 3,4 и 4,9 [16].



**Рис. 2.** Активность фитазы PhyOp при различных значениях pH(a) и температуры (b)

**Fig. 2.** Activity of phytase PhyOp at various pH (a) and temperatures (b)

Значение рН в желудке животных обычно имеет очень низкие значения от 2,0 до 2,5, однако, оно несколько повышается после кормления [29]. Значение рН пищеварительного тракта свиней варьирует от 2,0 до 5,5, однако, наибольшее количество времени (от 2 до 5 ч) пища переваривается при рН 4,0 [29].

Как показали исследования, у бройлеров фитаза должны быть наиболее активны в зобу (рН 4,0–5,0) и железистом желудке (рН 2,5–3,5) [30]. Таким образом, свойство фитазы PhуOr гидролизовать фитат в кислых условиях с оптимумом рН 4,0 позволит ей эффективно работать в гастроэнтеральном тракте животных.

Как видно из графика (рис. 2b), наибольшую активность фитаза проявляет в интервале температур от 45 до 55 °С, с оптимумом при 50 °С. Известно, что физиологическая температура свиней составляет около 39° С [31], а бройлеров 42 °С [32]. Из графика, представленного на рис. 2b, видно, что при 40 °С фитаза PhуOr-mod проявляет 80% от максимальной активности. Таким образом, предполагается, что фермент PhуOr будет эффективно работать в организме животных.

Была изучена термостабильность рекомбинантной фитазы (рис. 3).

Фермент PhуOr прогревали при различных температурах в интервале от 50 °С до 80 °С в течение 10 мин. Как видно из графика (рис 3), фитаза не обладает высокой термостабильностью. Она сохраняет около 60% фитазной активности после прогрева при 60 °С, и только 20% активности после прогрева при 80 °С.

Известно, что большинство бактериальных фитаз не являются термостабильными и теряют значительную часть своей активности после про-

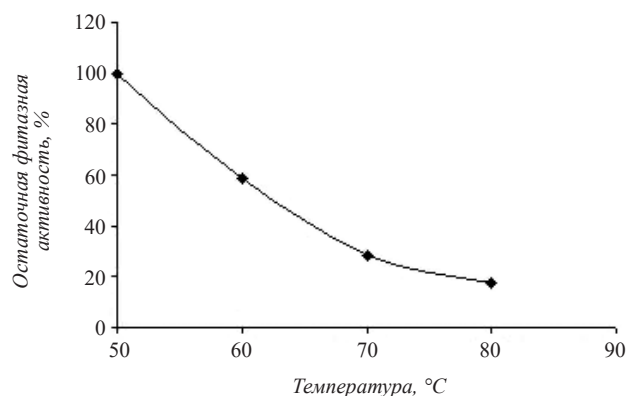


Рис. 3. Остаточная фитазная активность после прогрева при различных температурах в течение 10 мин

Fig. 3. Residual phytase activity after heating at various temperatures for 10 min

грева при высоких температурах [13]. Так, фитаза из *E. coli* сохраняет около 30% активности после 10-минутного прогрева при 80 °С [33]. Требование к фитазам по термоустойчивости обусловлено необходимостью кратковременного прогрева (5–10 мин) при повышенных температурах в процессе приготовления кормов. Однако для термочувствительных ферментов сейчас существуют альтернативные, более щадящие технологии, позволяющие обходиться без применения высоких температур при кормопроизводстве [34].

Было изучено влияние ионов металлов на активность фермента PhуOr (рис. 4).

Как видно из диаграммы (рис. 4), ЭДТА оказывает стимулирующее действие на активность фермента PhуOr, увеличивая ее на 15%. Напротив, ионы металлов Fe<sup>2+</sup> и Cu<sup>2+</sup>, а также SDS снижают активность фитазы на 58, 30 и 70%. Аналогичное влияние наблюдалось и на другие фитазы,

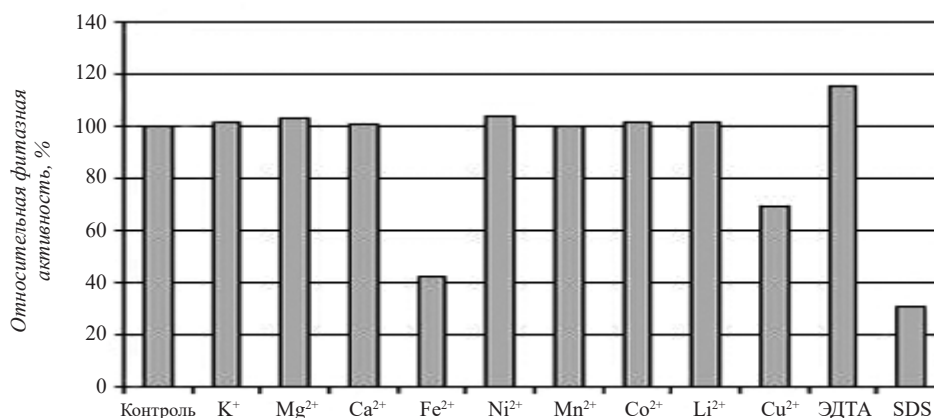


Рис. 4. Влияние ионов металлов на активность рекомбинантной фитазы PhуOr

Fig. 4. Effect of metal ions on activity of recombinant phytase PhуOr

например, из *Citrobacter freundii* [13], *Pedobacter nyackensis* [35]. Ингибирующий эффект может быть вызван конформационным изменением белка или образованием слабо растворимых комплексов ионов металлов с фитиновой кислотой [13].

Таким образом, в ходе данной работы впервые была выделена и охарактеризована очищенная рекомбинантная фитаза из бактерий *Obesumbacterium proteus*. Было показано, что фитаза PhyOp обладает высокой удельной активностью и необходимыми кинетическими характеристиками, а также показывает высокую активность при физиологических значениях pH и температуры животных. Была проведена оптимизация нуклеотидной последовательности гена, кодирующего фитазу, что привело к увеличению экспрессии фермента в дрожжах *P. pastoris* на 52%. Таким образом, рекомбинантная фитаза PhyOp обладает высоким потенциалом для использования в кормопроизводстве.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI57917X0145) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

## ЛИТЕРАТУРА

- Reddy N.R., Sathe S.K., Salunkhe D.K. Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.*, 1982, 28, 1–92.
- Woyengo T.A., Nyachoti C.M. Anti-nutritional effects of phytic acid in diets for pigs and poultry: current knowledge and directions for future research. *Can. J. Anim. Sci.*, 2013, 93, 9–21. doi: 10.4141/cjas2012-017
- Rimbach G., Pallauf J., Moehring J. Effect of dietary phytate and microbial phytase on mineral and trace element bioavailability. *Curr. Topics Nutraceutical Res.*, 2008, 6(3), 131–144.
- Dersjant-Li Y., Awati A., Schulze H., Partridge G. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *J. Sci. Food Agric.*, 2015, 95, 878–896. doi: 10.1002/jsfa.6998
- Jones C. K., Tokach M. D., Drits S. S. et al. Efficacy of different commercial phytase enzymes and development of an available phosphorus release curve for *Escherichia coli*-derived phytases in nursery pigs. *J. Anim. Sci.*, 2010, 88, 3631–3644. doi: 10.2527/jas.2010-2936
- Adeola O., Cowieson A.J. Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *J. Anim. Sci.*, 2011, 89, 3189–3218. doi: 10.2527/jas.2010-3715
- Cowieson A.J., Acamovic T., Bedford M.R. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *British Poultry Sci.*, 2004, 45(1), 101–108.
- Teng D., Fan Y., Yang Y., et al. Codon optimization of *Bacillus licheniformis*  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase gene and its expression in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 74, 1074–1083. doi: 10.1007/s00253-006-0765-z
- Li C., Lin Y., Zheng X., et al. Combined strategies for improving expression of *Citrobacter amalonaticus* phytase in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnology*, 2015, 15, 88. doi: 10.1186/s12896-015-0204-2
- Tai H. M., Yin L. J., Chen W. C., Jiang S. T. Overexpression of *Escherichia coli* phytase in *Pichia pastoris* and Its Biochemical Properties. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61(25), 6007–6015. doi: 10.1021/jf401853b
- Xiong A.S., Yao Q.H., Peng R.H., et al. High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 72(5), 1039–1047. doi: 10.1007/s00253-006-0384-8
- Huang H.Q., Luo H.Y., Bai Y.G., et al. Overexpression of *Citrobacter braakii* phytase with high specific activity in *Pichia pastoris*. *Acta Microbiologica Sinica*, 46(6), 945–950.
- Zhao W., Xiong A., Fu X., et al. High level expression of an acid-stable phytase from *Citrobacter freundii* in *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2010, 162, 2157–2165. doi: 10.1007/s12010-010-8990-4
- Gordeeva T.L., Borschevskaya L.N., Sineoky S.P. Improved PCR-based gene synthesis method and its application to the *Citrobacter freundii* phytase gene codon modification. *J. Microbiol. Methods*, 2010, 81(2), 147–152. doi: 10.1016/j.mimet.2010.02.013
- Mellitzer A., Weis R., Glieder A., Flicker K. Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11, 61. doi: 10.1186/1475-2859-11-61
- Zinin N.V., Serkina A.V., Gelfand M.S., et al. Gene cloning, expression and characterization of novel phytase from *Obesumbacterium proteus*. *FEMS Microbiol. Letters*, 2004, 236, 283–290. doi: 10.1016/j.femsle.2004.05.051
- Гордеева Т. Л., Борщевская Л. Н., Калинина А. Н., и др. Сравнительный анализ эффективности экспрессии генов бактериальных фитаз в дрожжах *Pichia pastoris* в чашечном тесте. *Биотехнология*, 2017, 33(6), 83–88. doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-83-88.
- Бабьева И. П., Голубев В. И. Методы выделения и идентификации дрожжей. М.: Пищевая промышленность, 1979, 48.
- Zhao X., Huo K., Li Y. Synonymous codon usage in *Pichia pastoris*. *Chin. J. Biotechnol.*, 2000, 16, 308–311.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL, 1989, 4–1626.
- 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., Yao B., Yuan T., et al. Overexpression of *Escherichia coli* phytase with high specific activity. *Chin. J. Biotechnol.*, 2004, 20, 78–84.

23. Akio K., Takayuki B., Toshitaka M., Hirotsune M. High expression of a synthetic *c* gene encoding potato  $\alpha$ -glucan phosphorylase in *Aspergillus niger*. *J. Biosci. Bioeng.*, 2005, 5, 531–537.
24. Clare J.J., Rayment F.B., Ballantine, S.P., et al. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology*, 1991, 9, 455–460.
25. Kim Y.O., Kim H.W., Lee J.H., et al. Molecular cloning of the phytase gene from *Citrobacter braakii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 2006, 28, 33–38.
26. Henry B.M. The effect of enzyme purity on the kinetics of tryptic hydrolysis. *J. General Physiology*, 1926, 10, 217–225.
27. Ullah A. H. J., Gibson, D. M. Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: Purification and characterization. *Preparative Biochemistry Biotechnology*, 1987, 17, 63–91.
28. Golovan S., Wang G., Zhang J., Forsberg C. W. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* appA encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Can. J. Microbiol.*, 2000, 46(1), 59–71.
29. Dersjant-Li Y., Awati A., Schulze H., Partridge G. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *J. Sci. Food Agric.*, 2015, 95(5), 878–896. doi: 10.1002/jsfa.6998
30. Liebert F., Wecke C., Schoner F. J. Phytase activities in different gut contents of chickens are dependent on level of phosphorus and phytase supplementations. In: Wenk C, Boessinger M, editor. Proceedings of 1st European Symposium Enzymes in Animal Nutrition, Karthause Ittingen, Switzerland, 1993, 202–205.
31. Neira-Vielmaa A.A., Aguilera C.N., Ilyinab A., et al. Purification and biochemical characterization of an *Aspergillus niger* phytase, produced by solid-state fermentation using triticale residues as substrate. *Biotechnol. Reports.*, 2018, 17, 49–54.
32. Welker J.S., Rosa A.P., Moura D.J., et al. Temperatura corporal de frangos de corte em diferentes sistemas de climatização. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2008, 37(8), 1463–1467.
33. Kim M.S., Lei X.G. Enhancing thermostability of *Escherichia coli* phytase AppA2 by error-prone PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 79, 69–75.
34. Humer E., Schwarz C., Schedle K. Phytate in pig and poultry nutrition. *J. Anim. Physiol. Animal. Nutrition*, 2015, 99, 605–625.
35. Huang H.Q., Shao N., Wang Y.R., et al. A novel betapropeller phytase from *Pedobacter nyackensis* MJ11 CGMCC 2503 with potential as an aquatic feed additive. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 83, 249–259.

## Expression and Characteristics of Phytases from *Obesumbacterium proteus* in *Pichia pastoris* Yeast

T.L. GORDEEVA<sup>1,\*</sup>, L.N. BORSHCHEVSKAYA<sup>1</sup>, A.N. KALININA<sup>1</sup>, S.P. SINEOKY<sup>1</sup>, S.P. VORONIN<sup>2</sup>, and M.D. KASHIRSKAYA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» – GOSNIIGENETIKA), 117545, Moscow Russia

<sup>2</sup>Joint Venture Bioamide, 410033, Saratov Russia

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

Received May 24, 2018

Accepted July 6, 2018

In order to increase the level of expression of recombinant phytases in the *Pichia pastoris* yeast, a synthetic sequence of the *phyOp-mod* gene that encodes phytase from *Obesumbacterium proteus* has been developed and optimized by codon composition. The GC content was adjusted to 48.33, and the AT-rich segments were eliminated. The main characteristics for the purified enzyme were established. The optimal pH and temperature values for the phytase PhyOp functioning proved to be equal to 4.0 and 50 °C, respectively. The specific activity, Michaelis constant (*K<sub>m</sub>*) and maximal rate of reaction (*V<sub>max</sub>*) with sodium phytate as a substrate was 1452 U/mg, 0.31 mM and 823 U/mg, respectively. It was shown that the optimization of the codon composition increased in the expression of the target product. The recombinant phytase designated as PhyOp demonstrated great potential for application as a feed additive due to its relatively high specific activity and good kinetic characteristics.

**Key words:** phytase from *Obesumbacterium proteus*, *Pichia pastoris*, codon optimization.

**Acknowledgements**—The work was financially supported by the Ministry of Education and Science of RF (Unique Identifier of the Project RFMEFI57917X0145) using Multipurpose Scientific Installation of National Bioresource Center All-Russian Collection of Industrial Microorganisms, NRC «Kurchatov Institute» – GOSNIIGENETIKA.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-4-18-25