

УДК 606

Увеличение продукции эндо-1,4-β-ксилаказы из *Paenibacillus brasilensis* в *Pichia pastoris*

© 2019 А. Н. КАЛИНИНА^{1,*}, Л. Н. БОРЩЕВСКАЯ¹, Т. Л. ГОРДЕЕВА¹, С. П. СИНЕОКИЙ¹

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

*e-mail: anna.kalininaa@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.10.2019 г.

После доработки 23.10.2019 г.

Принята к публикации 01.11.2019 г.

Получен штамм, продуцирующий эндо-1,4-β-ксилаказы из *Paenibacillus brasilensis* в дрожжах *Pichia pastoris* с активностью 54400 ед/мл за 140 ч ферментации в лабораторном ферментере. Для повышения уровня продукции ксиланазы был применен ряд подходов: оптимизация кодонного состава целевого гена, множественная интеграция экспрессионной кассеты в хромосому штамма-реципиента с использованием Cre-lox-системы рекомбинации, а также улучшение фолдинга гетерологического белка за счет суперэкспрессии гена *HAC1* из *Pichia pastoris*.

Ключевые слова: ксиланаза, ксилан, Cre-lox-система, Hac1p транскрипционный активатор, многокопийный штамм, *Paenibacillus brasilensis*, *Pichia pastoris*

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-30-38

Ксилан является основным компонентом гемицеллюлозы в клеточной стенке растения и представляет из себя гетерополисахарид, состоящий из β-(1,4)-связанной D-ксилозы [1]. При использовании растительного сырья в целлюлозно-бумажной и пищевой промышленности, кормопроизводстве и энергетике ксилан оказывает негативное влияние на свойства получаемых продуктов [2]. Ферментами, осуществляющими гидролиз ксиланов до ксиланолигосахаридов и D-ксилозы, являются эндо-1,4-β-ксилаказы (ЕС 3.2.1.8), которые входят в основную группу промышленных ферментов [3, 4].

Ксиланазы, выделенные из различных микроорганизмов, имеют различную структуру и физико-химические свойства [5].

Особый интерес представляют ксиланазы бактерий рода *Paenibacillus*. Они отличаются высокой удельной активностью, термостабильностью, широким диапазоном рабочих значений pH и температуры, что позволяет использовать их в различных отраслях промышленности [6–10].

Так, недавно была выделена и охарактеризована ксиланаза из *P. brasilensis* [11]. Фермент

обладает высокой удельной активностью, кинетическими показателями, характерными для высокоактивного фермента, умеренной термостабильностью, устойчивостью к действию пищеварительных ферментов и ингибиторам ксиланаз злаков. Такие свойства фермента позволяют характеризовать его как перспективный для использования в кормопроизводстве.

В настоящее время для получения рекомбинантных белков все чаще используют дрожжевые продуценты. Наиболее привлекательным объектом для создания штаммов-продуцентов рекомбинантных белков являются метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris*, благодаря их биобезопасности, легкости молекулярно-генетических манипуляций, мощным системам экспрессии генов и секреции рекомбинантных белков, способности достигать высоких плотностей клеток при культивировании в минимальных средах [12–16].

Существуют различные подходы, позволяющие повысить уровень экспрессии целевого белка в *P. pastoris*: оптимизация кодонного состава генов, кодирующих гетерологичные белки [17–21], увеличение количества копий экспрессионных

Список сокращений: а.о. аминокислотные остатки; ДНС-метод – метод определения ферментативной активности ксиланазы с ДНС-реактивом; ДНС – 3,5-динитросалициловая кислота (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS); пн – пара нуклеотидов; ОП₅₄₆ – оптическая плотность при длине волны 546 нм; ПЦР – полимеразная цепная реакция; YPD-среда – дрожжевой экстракт (Yeast Extract-Peptone-Dextrose Medium).

кассет, интегрированных в хромосому реципиентного штамма [12, 15, 22, 23], внутриклеточная коэкспрессия генов, кодирующих белки, способствующие улучшению фолдинга гетерологических белков. [22, 24]

Цель настоящей работы – создание штамма-суперпродуцента ксиланазы с использованием комбинации подходов, повышающих уровень экспрессии гетерологического белка в дрожжах *P. pastoris*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Микроорганизмы, питательные среды, плазмиды

Для генно-инженерных работ был использован штамм *Escherichia coli* XL1-Blue (*endA1 supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac hsdR17 F'*[proAB lacIqZΔM15 Tn10]), ВКПМ В-9838.

Штаммы *P. pastoris* ВКПМ Y-3261 и *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1334 были получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

LB-среда использовалась для культивирования *Escherichia coli* XL1 Blue (0,5%-ный дрожжевой экстракт («Диа-М», Россия), 1%-ный триптон («Диа-М»), 1%-ный NaCl («Химмед», Россия)), YPD-среда – для культивирования *P. pastoris*. (1%-ный дрожжевой экстракт («Диа-М»), 1,5%-ный триптон («Диа-М»), 2%-ная глюкоза («Химмед»)).

Оптимизация кодонов и синтез генов

Оптимизация кодонного состава гена *xy11* (GenBank: MK014302) проводили в программе GenScript (<https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis>). Для синтеза генов использовали метод, основанный на олигонуклеотидах [25].

Конструирование интегративных кассет

Интегративная кассета Pcup1-cre-loxKm состояла из следующих генетических элементов: ген *cre* бактериофага P1, индуцибельный промотор Pcup1 *Saccharomyces cerevisiae*, сигнал секреции α-MF *S. cerevisiae*, селективный маркер *KanR* под контролем дрожжевого TEF-промотора, сайты lox66 и lox71. ДНК фрагменты генетических элементов сшивали методом «фьюжн-ПЦР» и лигировали с ДНК вектора pRIS9, расщепленного эндонуклеазой рестрикции *Bgl*III.

Выделение хромосомной ДНК проводили с использованием комплекта реагентов для экспресс-выделения ДНК «ДНК-экспресс» («Синтол», Россия). Выделение и очистку ПЦР продуктов проводили с использованием набора GeneJET Gel Extractin Kit #KO692 (Fermentas, Литва).

Все стандартные генно-инженерные манипуляции (обработка ДНК ферментами, лигирование, трансформация клеток *E. coli*) соответствовали Методическим рекомендациям [27].

Получение реципиентного штамма *P. pastoris*

Интегративная кассета Pcup1-cre-loxKm была трансформирована в клетки штамма *P. pastoris* ВКПМ Y-3261 методом электропорации (http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf). Селекцию трансформантов проводили на агаризованной среде YPD в течение 5 сут при температуре 30 °С. В качестве селективного агента добавлялся антибиотик G418 в количестве 500 мкг/мл.

Для выщепления маркерного гена клетки отобранного трансформанта выращивали в жидкой питательной среде YPD до концентрации $1 \cdot 10^8$ кл./мл, после чего добавляли раствор сульфата меди до концентрации 0,3 мМ, инкубировали в течение 3 ч, затем клетки высеивали на агаризованную питательную среду YPD. Отбирали колонии, не способные к росту в присутствии антибиотика G418.

Таким образом был получен штамм *P. pastoris* ВКПМ Y-4392.

Конструирование рекомбинантных экспрессионных плазмид

Фрагмент ДНК, представляющий собой оптимизированную нуклеотидную последовательность гена *xy11-op*, кодирующего зрелый белок Xyl1, был амплифицирован методом ПЦР с использованием *Pfu* ДНК-полимеразы (Fermentas) и двух праймеров *xy11-op-f* 5'-aaagaattcgctactgactactggcaaaactggactgac-3' и *xy11-op-r* 5'-aaagcggccgcttaccacaacagtaacgttagaagaacsa-3'. Амплифицированный продукт был обработан эндонуклеазами рестрикции *Eco*RI и *Not*I и клонирован в состав вектора pAOX2-PAOX1-loxKm в единую рамку считывания с сигнальной последовательностью вектора, в результате чего была получена рекомбинантная плазида pAOX2-PAOX1-Xyl1-loxKm.

Конструирование рекомбинантных штаммов *P. pastoris*

Плазида pAOX2-PAOX1-Xyl1-loxKm была линеаризована с использованием рестриктаз *Sph*I и *Bgl*III и трансформирована в клетки штамма *P. pastoris* ВКПМ Y-4392 методом электропорации.

Селекцию трансформантов вели на агаризованной среде YPD в течение 5 сут при температуре 30 °С. В качестве селективного агента добавлялся антибиотик G418 в количестве 500 мкг/мл.

Для отбора наиболее продуктивных трансформантов проводили их культивирование в жидкой ферментационной питательной среде

YP (1%-ный дрожжевой экстракт («Диа-М»)), 1,5%-ный триптон («Диа-М») с добавлением метанола (3 мас. %) в 96-луночных планшетах для культивирования (Greiner Bio-One, Германия) при 30 °С в течение 72 ч на качалке (250 об/мин).

Анализ ферментативной активности

Определение активности ксиланазы в культуральной жидкости проводили с использованием ДНС-метода [28] в 96-луночном планшете. В каждой лунке смешивали 25 мкл 1%-ного раствора субстрата ксилана березы (Sigma, США) в 0,5 М ацетатном буфере (рН 6) и 25 мкл культуральной жидкости (КЖ). Инкубацию проводили при 50 °С 10 мин, после чего добавляли в лунки по 50 мкл раствора ДНС. Планшет прогревали при 99 °С 10 мин и измеряли оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 546 нм (ОП₅₄₆). В качестве стандарта использовали раствор глюкозы. По результатам ферментации отбирали наиболее продуктивные трансформанты и проводили выщепление маркерного гена (см. раздел «Получение реципиентного штамма *P. pastoris*»). Процедуру трансформации плазмиды рАОХ2-рАОХ1-Xyl1-loxKm в отобранные наиболее продуктивные штаммы повторяли 5 раз, отбирая на каждом этапе наиболее продуктивные трансформанты. Таким образом, был получен штамм *P. pastoris* Xyl 918.

Интегративная экспрессионная кассета рGAP-НАС1¹-loxKm была трансформирована в клетки штамма *P. pastoris* Xyl 918 методом электропорации. Селекцию трансформантов, отбор наиболее продуктивных клонов и выщепление маркерного гена проводили как было описано ранее. Таким образом, был получен штамм *P. pastoris* Xyl-НАС 302.

Ферментация рекомбинантных штаммов *P. pastoris*

Для получения инокулята штаммы выращивали в течение 24 ч при 28 °С и аэрации 250 об/мин в жидкой питательной среде YPD. Полученным инокулятом засеивали колбы с 50 мл среды YP с источником углерода 1%-ным глицерином в соотношении 1:10 и выращивали при 28 °С и аэрации 250 об/мин в течение 96 ч. Через каждые 24 ч культивирования добавляли 1% метанола. После окончания ферментации определяли активность ферментов в КЖ.

Анализ ферментативной активности

Стандартное определение активности ксиланазы проводили в 100 мкл, смешивая 50 мкл 0,5%-ного раствора ксилана березы (Sigma) в 0,5 М ацетатном буфере (рН 6) и 50 мкл образца фермента. Инкубацию проводили 10 мин при 50 °С.

За единицу активности фермента принимали количество фермента, требуемого для конверсии 1 мкМ восстанавливающих сахаров за 1 мин.

Ферментация в 3-литровом ферментере

Ферментацию штаммов *P. pastoris* Xyl 918 и *P. pastoris* Xyl-НАС 302 проводили в лабораторном ферментере КФ 103/4 («Проинтех», Россия) в соответствии с Руководством по процессу ферментации *Pichia pastoris* фирмы «Invitrogen» (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pichiaferm_prot.pdf).

Определение концентрации белка

Концентрацию общего белка в КЖ определяли методом Брэдфорда [29].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация кодонов гена *xyl1*, кодирующего эндо-1,4-β-ксилазу из *Paenibacillus brasiliensis*

Оптимизация нуклеотидных последовательностей целевых генов в соответствии с частотой встречаемости кодонов в метилотрофных дрожжах *P. pastoris* является эффективной стратегией для улучшения уровня экспрессии гетерологического гена и увеличения продуктивности штаммов. Так, ранее было показано, что оптимизация кодонов в последовательности гена *xynB*, кодирующего эндо-β-1,4-ксилазу из *Aspergillus usamii*, привела к увеличению продуктивности рекомбинантного штамма *P. pastoris* на 59% [30].

Оптимизация достигается, как правило, заменой редких кодонов в нуклеотидной последовательности на предпочтительные для используемого штамма-хозяина, устранением АТ-богатых участков и корректировкой содержания GC-пар в соответствии с данными, полученными для высокоэкспрессируемых генов в *P. pastoris*. [31, 32]

Анализ, выполненный с помощью программы GenScript (<https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis>), показал, что кодонный состав нуклеотидной последовательности гена *xyl1*, кодирующего эндо-1,4-β-ксилазу из *P. brasiliensis* (Xyl1) не является оптимальным для высокоэффективной экспрессии данного фермента в *P. pastoris*. Так, редкие тандемные кодоны, которые могут снизить эффективность трансляции, составляют 13%, а индекс адаптации кодонов (CAI) равен 0,63. Оптимизация нуклеотидной последовательности гена *xyl1* была проведена в соответствии с частотой встречаемости кодонов в метилотрофных дрожжах *P. pastoris* [33], в результате чего CAI был повышен до 0,96, а низкочастотные кодоны заменены. Гомология нуклеотидной

последовательности оптимизированного гена *xy11-op* составила 75% с последовательностью нативного гена *xy11*. Данные по выравниванию нуклеотидных последовательностей нативного и оптимизированного генов приведены на рис. 1.

Получение рекомбинантного многокопийного штамма-продуцента ксиланазы

Одним из подходов для успешного конструирования высокопродуктивных рекомбинантных штаммов является интеграция в состав хромосомы многокопийных вставок целевых генов.

Для увлечения копий интегрированных экспрессионных кассет проводят несколько раундов трансформации, однако применение данного под-

хода ограничивается набором используемых маркерных генов. Для выщепления маркерного гена после раунда интеграции и его повторного использования применяют Cre-lox-систему рекомбинации бактериофага P1 [34, 35]. Известны примеры успешного использования данного подхода в мезофильных дрожжах для увеличения числа копий целевых генов [36, 37], для коэкспрессии генов [11], для введения делеций в хромосому реципиентного штамма [37]. Во всех приведенных выше примерах ген *cre*, кодирующий рекомбиназу, находится под контролем мощного АОХ1 промотора и входит в состав интеграционной кассеты для экспрессии гетерологического гена или для введения генетических делеций.

<i>xy11</i>	CGCACAGACTACTGGCAAAATTGGACCGATGGCGGTGGGACGGTТААТGCTGTТААТGGG
<i>xy11-op</i>	GCTACTGACTACTGGCAAAACTGGACTGACGGTGGTGGTACTGTТАACGCTGTТАACGGT ** ** ***** ** ** ***** ** ***** ***** **
<i>xy11</i>	TCCGGCGGCAATTACAGCGTAACATGGAAGAATAGTGGGAATTTTGTGTGTCGGCAAAGGC
<i>xy11-op</i>	TCTGGTGGTAACTACTCTGTТАCTTGGAGGACACTGGTAACTTCGTTGTTGGTAAAGGT ** ** ** * * * * * ** ** ***** * * ** * * * * * ** * * * * *
<i>xy11</i>	TGGACTACTGGATCGCCAGACAGAACGATТААТTACAATGCCGGTGTCTGGGCGCCGTCC
<i>xy11-op</i>	TGGACTACTGGTTCCTCAAACAGAACTATCAACTACAACGCTGGTGTТTGGGCTCCATCT ***** ** * * * * * ***** ** ** ***** ** ***** ***** ** **
<i>xy11</i>	GGTAATGGATATTTGGCCCTCTACGGGTGGACGAGAACTCACTCATCGAATATТАCГTТ
<i>xy11-op</i>	GGTAACGGTТАCTTGGCTTTGTACGGTTGGACTAGAACTCTTTGATCGAATACTACГTТ ***** ** *
<i>xy11</i>	GTTGATAGCTGGGGGACTTATCGACCTACCGAACGTATAAAGGTACGGTGACCAGTGAT
<i>xy11-op</i>	GTTGACTCTTGGGGTACTTACAGACCAACTGGTACTTACAAGGGTACTGTTACTTCTGAC ***** *
<i>xy11</i>	GGGGGCACATATGACATCTACACAACAATGCGATACGATGCACCTTCTATTGAAGGCCAA
<i>xy11-op</i>	GGTGGTACTTACGACATCTACACTACTATGAGATACGACGCTCCATCTATCGAAGGTGAA ** ** * * * * * ***** ** * * * * * ***** ** * * * * * ***** ***** **
<i>xy11</i>	AAAAAGCATTТTATCAGTACTGGAGTGTTCGACAGACGAAGAGACCGACCGGGGGCAAC
<i>xy11-op</i>	AAGACTACTTTTCAТCААТАCTGGTCTGTТАGACAATCTAAGAGACCAACTGGTGGTAAТ ** ** * * * * * ***** ***** *
<i>xy11</i>	TCCACGATCACTTTCAGCAATCAGTGAAGGCTTGGGCGAGCAAAGGAATGCATCTGGGG
<i>xy11-op</i>	TGACTATCAGATCTCTAACCACGTTAAGGCTTGGGCTTCTAAGGGTATGAACTTGGGT ** ** ***** ** * * * * * ***** ***** ** * * * * * * * * * *
<i>xy11</i>	AACAACGGTCTTACCAGGTGTТАGCGACAGAGGGGTATCAGAGTAGCGGGAGCTCTAAC
<i>xy11-op</i>	TCTAACTGGTCTTACCAGTТTТGGCTACTGAAGGTTACCAATCTTCTGGTCTTCTAAC ***** ***** ** *
<i>xy11</i>	GTAACGGTGTGGTAA
<i>xy11-op</i>	GTTACTGTTTGGTAA ** ** * * * * * *****

Рис. 1. Выравнивание нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих ксиланазу из *P. brasiliensis* (*Xy11*): *xy11* – нативная последовательность гена, *xy11-op* – оптимизированная по кодонному составу последовательность гена. (*) – идентичные нуклеотиды в последовательностях; (без *) – нуклеотидные замены в оптимизированной последовательности

Fig. 1. Alignment of nucleotide sequences of genes encoding xylanase from *P. brasiliensis* (*Xy11*): *xy11* – native gene sequence, *xy11-op* – codon composition optimized gene sequence. (*) – identical nucleotides in the sequences; (no *) – nucleotide substitutions in optimized sequence

Недостатком такого подхода можно считать то, что ген *cre* находится под контролем очень сильного промотора, в то время как продукт этого гена является токсичным белком, избыточное накопление которого негативно влияет на дрожжевые клетки и может приводить к их гибели. Кроме того, недостатком можно считать также громоздкость генетических конструкций, что может негативно сказываться на эффективности интеграции целевой кассеты.

Чтобы избежать негативного влияния избыточного накопления Cre рекомбиназы, был сконструирован штамм-реципиент *P. pastoris*, в геном которого был интегрирован ген, кодирующий Cre рекомбиназу бактериофага P1, под контролем слабого строго индуцибельного *Pscp1* промотора из *S. cerevisiae*. Ранее было показано, что *Pscp1*-промотор достаточно эффективно работает в дрожжах *P. pastoris*, при этом силу его индукции можно регулировать с помощью изменения концентрации ионов меди в среде культивирования [38]. Использование слабого индуцибельного промотора позволило избежать гибели клеток из-за токсического воздействия рекомбиназы. Полученный в результате работы штамм был депонирован в БРЦ ВКПМ под номером Y-4392.

Для получения рекомбинантных штаммов *P. pastoris* с высокой продуктивностью ксиланазы был разработан вектор pAOX2-PAOX1-loxKm (рис. 2), экспрессионная кассета кото-

рого включает в себя: мощный индуцибельный промотор PAOX1 и терминатор транскрипции TTAOX1 *P. pastoris*, сигнальную последовательность α -фактора *S. cerevisiae*, селективный маркер *KanR*, кодирующий ген устойчивости к генетицину (G418) под контролем дрожжевого TEF-промотора, фланкированный сайтами lox66 и lox71. Данный вектор позволяет осуществлять интенсивный синтез целевого фермента после накопления высокой концентрации дрожжевой биомассы при использовании в качестве индуктора метанола и добиваться высокой концентрации целевого белка в культуральной жидкости. Использование коротких последовательностей 5'AOX2 и 3'AOX2 (менее 40 пн) в качестве области встраивания интеграционной кассеты позволяет преимущественно использовать механизм негомологичной рекомбинации (NHEJ) [39], что приводит к увеличению копий экспрессионной кассеты в составе хромосомы реципиентного штамма. Использование дрожжевого селективного маркера, фланкированного lox-сайтами, позволяет осуществлять выщепление маркерного гена за счет использования Cre-lox-системы бактериофага P1.

Оптимизированная нуклеотидная последовательность гена *xyl1-op*, кодирующего зрелую область фермента ксиланазы *P. brasiliensis* (Xyl1), была клонирована в единую рамку считывания с сигнальной последовательностью α -фактора

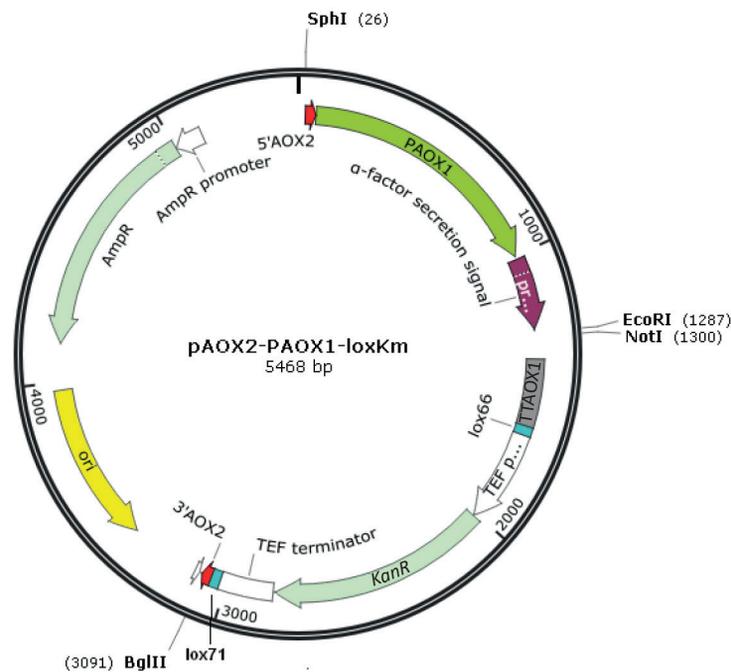


Рис. 2. Физическая карта экспрессионного вектора pAOX2-PAOX1-loxKm. В скобках указано положение сайтов рестрикции на карте вектора. Обозначения даны в тексте

Fig. 2. Physical map of the expression vector pAOX2-PAOX1-loxKm. In parentheses the position of restriction sites is shown on the map of the vector

вектора рАОХ2-РАОХ1-loxKm. Таким образом, была сконструирована экспрессионная плаزمида рАОХ2-РАОХ1-Xyl1-loxKm.

Экспрессионная плазмида рАОХ2-РАОХ1-Xyl1-loxKm была линейаризована и трансформирована в клетки штамма *P. pastoris* ВКПМ У-4392. Отбор наиболее активного трансформанта осуществляли с помощью анализа ксиланазной активности в культуральной жидкости, после чего проводили выщепление маркерного гена *KanR* из экспрессионной кассеты, интегрированной в хромосому отобранного клона. Полученный трансформант продуцировал эндо-1,4-β-ксиланазу с активностью 851 ед/мл КЖ при культивировании в 500-мл колбе в течение 96 ч.

В клетки отобранного штамма вновь трансформировали плазмиду рАОХ2-РАОХ1-Xyl1-loxKm, отбирали наиболее продуктивный трансформант и проводили выщепление маркерного гена. Процедуру трансформации плазмиды рАОХ2-РАОХ1-Xyl1-loxKm в отобранные наиболее продуктивные штаммы повторяли пять раз, отбирая на каждом этапе наиболее продуктивные трансформанты. Схема конструирования штамма-продуцента ксиланазы показана на рис. 3.

В результате работы был отобран штамм *P. pastoris* Xyl 918, способный синтезировать эн-

до-1,4-β-ксиланазу *P. brasiliensis* в количестве 2580 ед/мл КЖ при культивировании в 500-мл колбе в течение 96 ч, т.е. последовательная множественная интеграция целевого гена позволила увеличить продуктивность штамма в 3 раза.

Коэкспрессия гена *HAC1ⁱ*

Известно, что сверхэкспрессия гетерологических генов в дрожжевых клетках может вызывать накопление неправильно свернутых белков в эндоплазматическом ретикулуме, что перегружает секреторный аппарат клетки и негативно сказывается на продуктивности штамма [40].

Одним из подходов к повышению продукции секреторных белков в *P. pastoris* является сверхэкспрессия гена *HAC1ⁱ* из *S. cerevisiae* и *P. pastoris*, что позволяет увеличить продукцию некоторых гетерологических ферментов в 0,4–11,1 раз [41].

Процессированный белок Hac1p, кодируемый геном *HAC1ⁱ*, является активатором транскрипции нескольких генов-мишеней посредством связывания с мотивом последовательности ДНК, называемым элементом Unfolded Protein Response (UPR). Мишенями белка Hac1p являются гены, кодирующие шапероны, фолдазы и белки, участвующие в метаболизме липидов и инозитов. Hac1p является мощным активатором транскрипции, его

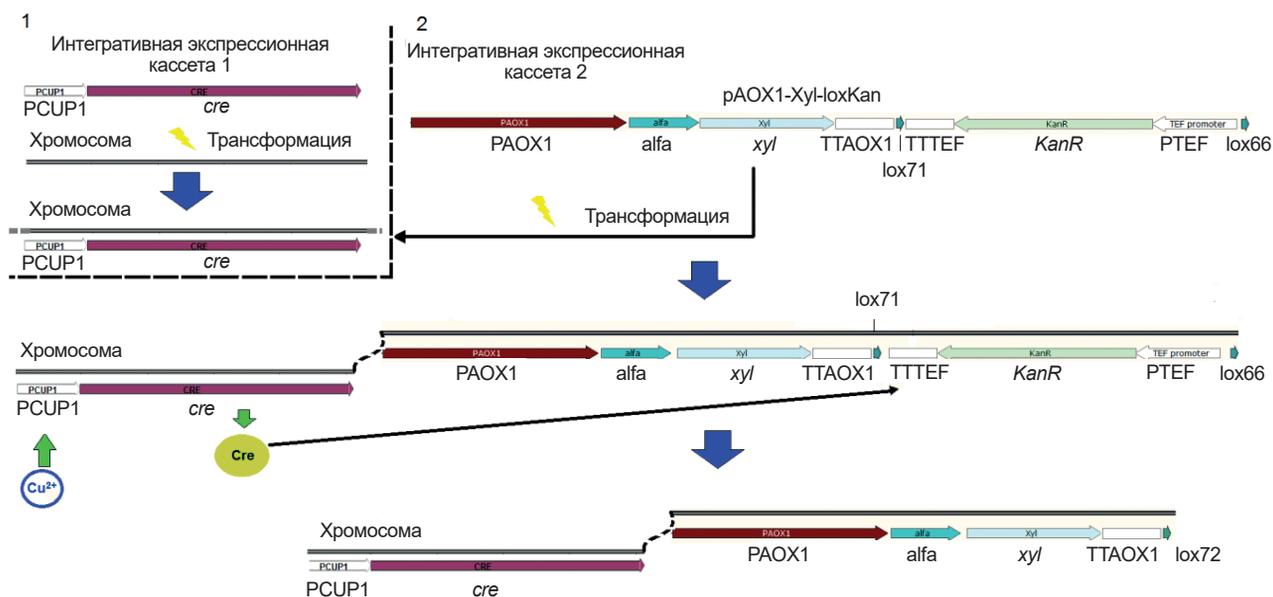


Рис. 3. Схема конструирования многокопийного штамма-продуцента ксиланазы. 1 – этап редактирование генома штамма *Pichia pastoris*, 2 – последовательная интеграция экспрессионной кассеты. PCUP1 – индуцибельный Pcup1-промотор; *cre* – ген, кодирующий рекомбиназу Cre; PAOX1 – промотор гена АOX1; alfa – сигнальная последовательность альфа-фактора; *xyl* – оптимизированная нуклеотидная последовательность гена *xyl*, кодирующая область зрелого белка ксиланазы *Paenibacillus brasiliensis*; *KanR* – маркерный ген устойчивости к антибиотику G418

Fig. 3. Scheme for the construction of a multi-copy strain producing xylanase. 1 – stage editing the genome of the strain *Pichia pastoris*, 2 – repeated integration of the expression cassette. PCUP1 - inducible Pcup1 promoter; *cre* - gene encoding Cre – recombinase; PAOX1 – AOX1 gene promoter; alfa – α -factor secretion signal; *xyl* is an optimized nucleotide sequence encoding the region of the mature xylanase protein of *Paenibacillus brasiliensis*; *KanR* – marker gene for antibiotic resistance G418

сверхэкспрессия приводит к повышению экспрессии как нативных, так и гетерологичных белков, а также к увеличению мембраны эндоплазматического ретикула. Таким образом, *Has1p* может быть использован для увеличения продукции белков в клетках дрожжей путем одновременной активации UPR и экспрессии генов, кодирующих целевые белки.

В ходе работы была сконструирована экспрессионная кассета, содержащая в своем составе сплайсированный вариант гена *HAC1ⁱ* из *P. pastoris* под контролем конститутивного промотора PGAP, а также маркерный ген *KanR*, фланкированный lox-сайтами. Кассета была трансформирована в клетки многокопийного штамма-продуцента ксиланазы *P. pastoris* Xyl 918. Отбор наиболее активного трансформанта осуществляли с помощью анализа ксиланазной активности в КЖ, после чего проводили выщепление маркерного гена *KanR* из экспрессионной кассеты, интегрированной в хромосому отобранного клона. Полученный трансформант *P. pastoris* Xyl-НАС 302 продуцировал ксиланазу с активностью 3620 ед/мл КЖ при культивировании в 500-мл колбе в течение 96 ч. Таким образом, сверхэкспрессия сплайсированного гена *HAC1ⁱ* из *P. pastoris* позволила увеличить продуктивность штамма на 40,3% при культивировании в колбах.

Оценка биотехнологического потенциала полученных штаммов-продуцентов ксиланазы

Для оценки биотехнологического потенциала штаммов *P. pastoris* Xyl 918 и *P. pastoris* Xyl-НАС 302 было проведено их культивирование в 3-литровых лабораторных ферментерах.

Как показано на рис. 4, максимальная ксиланазная активность и концентрация общего белка

для штамма *P. pastoris* Xyl 918 достигали 41500 ед/мл и 4,75 г/л, а для штамма *P. pastoris* Xyl-НАС 302 – 54400 ед/мл и 4,93 г/л за 140 ч. культивирования при одинаковых условиях ферментации. Полученные результаты показали, что сверхэкспрессия сплайсированного гена *HAC1ⁱ* из *P. pastoris* в штамме-продуценте, содержащем в составе хромосомы несколько копий гена *xyl1-op*, привела к увеличению продуктивности на 31% при культивировании в лабораторном ферментере. Однако концентрация общего белка возросла всего на 3,8%. Возможно, такой рост продуктивности связан не с секрецией целевого белка, а с увеличением количества правильно свернутых молекул фермента, что объясняется позитивным влиянием *Has1p* на фолдинг ксиланазы.

Таким образом, использованием комбинации подходов, таких как оптимизация кодонов гена, кодирующего ксиланазу, получение штамма с множественным встраиванием экспрессионной кассеты в хромосому реципиентного штамма, а также улучшение фолдинга целевого фермента позволило получить высокопродуктивный штамм *P. pastoris*, секретирующий эндо-1,4-β-ксиланазу *P. brasiliensis*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI60717X0180) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

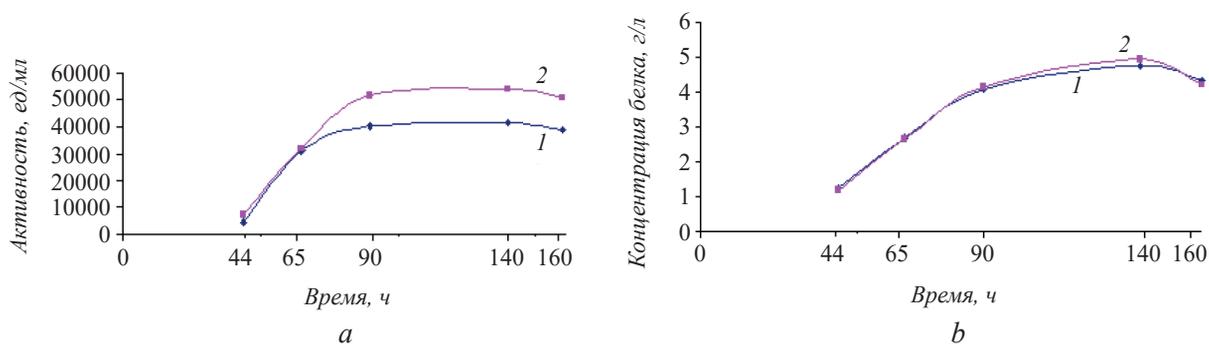


Рис. 4. Ксиланазная активность (a) и концентрация общего белка (b) в процессе ферментации в 3-литровом ферментере штаммов *P. pastoris* Xyl 918 (1), *P. pastoris* Xyl-НАС 302 (2). На графиках показаны средние значения, полученные в результате проведения трех независимых измерений с учетом погрешности измерения ($p < 0,05$)

Fig. 4. Xylanase activity (a) and total protein contents (b) during fermentation in a 3-L fermentor of strains *P. pastoris* Xyl 918 (1), *P. pastoris* Xyl-НАС 302 (2). The data shown in the graphs represent the average value obtained as a result of three independent measurements, taking into account the measurement error ($p < 0.05$).

ЛИТЕРАТУРА

- Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 56(3–4), 326–338. doi: 10.1007/s002530100704
- Polizeli M.L.T.M., Rizzatti A.C.S., Monti R., et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 67(5), 577–591. doi: 10.1007/s00253-005-1904-7
- Gregory A.C.E., O’Connell A.P., Bolwell G.P. Xylans, *Biotechnol. Genetic Engineering Rev.*, 1998, 15(1), 439–456.
- Prade R.A. Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotechnol. Genetic Engineering Rev.*, 1996, 13, 101–131.
- Subramaniyan S., Prema P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical Rev. Biotechnol.*, 2002, 22(1), 33–64. doi: 10.1080/07388550290789450
- Zheng H.C., Liu Y.H., Liu X.G., et al. Isolation, Purification and Characterization of a Thermostable Xylanase from a Novel Strain *Paenibacillus campinasensis* G1-1. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 22(7), 930–938. doi: 10.4014/jmb.1110.10060.
- Ghio S., Insani E.M., Piccinni F.E., et al. GH10 Xyn A is the main xylanase identified in the crude enzymatic extract of *Paenibacillus* sp. A59 when grown on xylan or lignocellulosic biomass. *Microbiol. Res.*, 2016, 186, 16–26. doi: 10.1016/j.micres.2016.02.006
- Ko C.H., Tsaia C.H., Tu J., et al. Molecular cloning and characterization of a novel thermostable xylanase from *Paenibacillus campinasensis* BL11. *Proc. Biochem.*, 2010, 45, 1638–1644. doi: 10.1016/j.procbio.2010.06.015
- Hwang I.T., Lim H.K., Song H.Y., et al. Cloning and characterization of a xylanase KRICT PX1 from the strain *Paenibacillus* sp. HPL-001. *Biotechnol. Adv.*, 2010, 28, 594–601. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.05.007
- Lee H. J., Shin D. J., Cho N. C., et al. Cloning, expression and nucleotide sequences of two xylanase genes from *Paenibacillus* sp. *Biotech. Lett.*, 2000, 22, 387–392.
- Калинина А.Н., Гордеева Т.Л., Синецкий С.П. Экспрессия гена ксиланазы из *Paenibacillus brasiliensis* X1 в *Pichia pastoris* и характеристика рекомбинантного белка. *Биотехнология*, 2018, 34(6), 22–32.
- Macauley-Patrick S., Fazenda M.L., McNeil B., et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.*, 2005, 22, 249–270. doi: 10.1002/yea.1208
- Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J., et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.*, 2000, 16, 23–52. doi: 10.1385/MB:16:1:23
- Hohenblum H., Gasser B., Maurer M., et al. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, 85, 367–75. doi: 10.1002/bit.10904
- Ahmad M., Hirz M., Pichler H., Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98, 5301–5317. doi: 10.1007/s00253-014-5732-5
- Wegner G. Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1990, 7, 279–283.
- Chang S.W., Lee G.C., Shaw J.F. Codon optimization of *Candida rugosa lip1* for improving expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified recombinant LIP1 lipase. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 3, 815–822. doi: 10.1021/jf052183k
- Sinclair G., Choy F.Y.M. Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, 2002, 26, 96–105.
- Nikolay S.O., Willem J.S., Maarten A.J. Optimization of the expression of equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, 2002, 24, 18–24.
- Masaru K., Kazuhiro M., Makiko H., et al. Mycobacterial codon optimization enhances antigen expression and virus-specific immune responses in recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette–Guerin expressing human immunodeficiency virus type 1 gag. *J. Virol.*, 2005, 8, 8716–8723. doi: 10.1128/JVI.79.14.8716-8723.2005
- Teng D., Fan Y., Yang Y.L., et al. Codon optimization of *Bacillus licheniformis* β-1, 3-1, 4-glucanase gene and its expression in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 74(5), 1074–1083. doi: 10.1007/s00253-006-0765-z
- Gasser B., Maurer M., Gach J., et al. Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments. *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 94(2), 353–361. doi: 10.1002/bit.20851
- Mansur M., Cabello C., Hernandez L., et al. Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.*, 2005, 27, 339–345.
- Guerfal M., Ryckaert S., Jacobs P.P., et al. The HAC1 gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins. *Microb. Cell Fact.*, 2010, 9, 49–57. doi: 10.1186/1475-2859-9-49
- Gordeeva T.L., Borschevskaya L.N., Sinecky 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
- Horton R.M., Hunt H.D., Ho S.N., et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 1989, 77, 61–68.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory manual. Texas, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 5-1620
- Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chem.*, 1959, 31(3), 426–428.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248–254.
- Wang J., Li Y., Liu D. Improved Production of *Aspergillus usami* endo-β-1,4-Xylanase in *Pichia pastoris* via Combined Strategies. *BioMed. Res. Int.*, 2016, ID 3265895, 1–9. doi: 10.1155/2016/3265895

31. Li Y., Zhang B., Chen X., et al. Improvement of *Aspergillus sulphureus* endo- β -1,4-xylanase expression in *Pichia pastoris* by codon optimization and analysis of the enzymic characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2010, 160(5), 1321–1331. doi: 10.1007/s12010-009-8621-0
32. Yang J.K., Liu L.Y. Codon optimization through a two step gene synthesis leads to a high-level expression of *Aspergillus niger* lip2 gene in *Pichia pastoris*. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 63(3–4), 164–169. doi: 10.1016/j.molcatb.2010.01.011
33. Zhao X., Huo K., Li Y. Synonymous codon usage in *Pichia pastoris*. *Chin. J. Biotechnol.*, 2000, 16, 308–311.
34. Suzuki N., Tsug, Y., Inui M., Yukawa H. Cre/loxP-mediated deletion system for large genome rearrangements in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbial. Biotechnol.*, 2005, 67(2), 225–233. doi: 10.1007/s00253-004-1772-6
35. Lambert J.M., Bongers R.S., Kleerebezem M. Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73(4), 1126–1135. doi: 10.1128/AEM.01473-06
36. Li C., Lin Y., Zheng X., et al. Recycling of a selectable marker with a self-excisable plasmid in *Pichia pastoris*. *Scientific Reports*, 2017, 7(1), 11113–11121. doi: 10.1038/s41598-017-11494-5
37. Pan R., Zhang J., Shen W-L., et al. Sequential deletion of *Pichia pastoris* genes by a self-excisable cassette. *FEMS Yeast Res.*, 2011, 11, 292–298. doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00716.x
38. Koller A., Valesco J., Subramani S. The CUP1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* is inducible by copper in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 2000, 16, 651–656.
39. Näätsaari L., Mistlberger B., Ruth C., et al. Deletion of the *Pichia pastoris* KU70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology. *PLoS ONE*, 2012, 7:e39720. doi: 10.1371/journal.pone.0039720
40. Hohenblum H., Gasser B., Maurer M., et al. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, 85, 367–375. doi: 10.1002/bit.10904
41. Huang M., Gao Y., Zhou X., et al. Regulating unfolded protein response activator HAC1p for production of thermostable raw-starch hydrolyzing alpha-amylase in *Pichia pastoris*. *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 2017, 40, 341–350. doi: 10.1007/s00449-016-1701-y

Increase in the Production of Endo-1,4- β -Xylanase from *Paenibacillus brasilensis* in *Pichia pastoris*

A. N. KALININA^{1,*}, L. N. BORSHCHEVSKAYA¹, T. L. GORDEEVA¹, S. P. SINEOKY¹

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

*e-mail: anna.kalininaa@yandex.ru

Received October 10, 2019

Revised October 23, 2019

Accepted November 1, 2019

Abstract—A *Pichia pastoris* yeast strain producing endo-1,4- β -xylanase from *Paenibacillus brasilensis* with an activity of 54,400 U/mL after 140 h of fermentation in a laboratory fermenter has been obtained. A number of approaches were used to increase the level of the xylanase production in this strain: optimization of the target gene codon composition, multiple integration of the expression cassette into the recipient strain chromosome using the Cre-lox recombination system, and also improving the heterologous protein folding via the overexpression of the HAC1i gene from *Pichia pastoris*.

Key words: xylanase, xylan, Cre-lox system, HAC1p transcriptional activator, multicopy strain, *Paenibacillus brasilensis*, *Pichia pastoris*

Funding—The work was performed with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia (Unique Project Identifier RFMEFI60717X0180) using the Multipurpose Scientific Installation of «All-Russian Collection of Industrial Microorganisms» National Bio-Resource Center, NRC «Kurchatov Institute» – GosNIIgenetika.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-30-38