

УДК 577.21

## Увеличение термостабильности фитазы из *Citrobacter freundii* методом сайт-направленного насыщающего мутагенеза

© 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>, М.Д. КАШИРСКАЯ<sup>2</sup>, С.П. ВОРОНИН<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, Россия

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

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

Поступила 12.10.2018 г.

После доработки 13.11.2018 г.

Принята в печать 15.12.2018 г.

Фитазы широко используются для улучшения питательных свойств комбикормов. Благодаря высокой удельной активности фитаза PhуА-Cf из *Citrobacter freundii* представляет особый интерес для агробиотехнологии. Для снижения инактивации фермента во время гранулирования корма при 60–80 °С была увеличена термостабильность фитазы PhуА-Cf методом сайт-направленного насыщающего мутагенеза. Мутантные гены клонировали в вектор рР10 под GАР-промотор и экспрессировали в клетках дрожжей *Pichia pastoris*. По сравнению с ферментом дикого типа, вариант К46М/К138Е показал 35%-ное увеличение термостабильности при 80 °С в течение 10 мин. Анализ пространственной модели фермента показал, что существенное влияние на изменение термостабильности белка оказала замена К138Е, расположенная на поверхности фермента в области петли с высоко неупорядоченной структурой «coil». Было показано, что введенные мутации не оказывают существенного влияния на промышленно значимые характеристики фермента, в том числе удельную активность, температурный и рН профили.

*Ключевые слова:* фитаза *Citrobacter freundii*, термостабильность, дрожжи *Pichia pastoris*, сайт-направленный насыщающий мутагенез

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-6-33-42

Фитазы (мио-инозит-гексакисфосфат-фосфогидролазы) катализируют последовательный гидролиз фитата с отщеплением неорганического фосфата. Добавление фитаз в комбикорма позволяет повысить усвоение фосфора в гастроэнтеральном тракте моногастричных животных и снизить его выделение в окружающую среду [1]. Для использования в промышленности фитазы должны обладать высокой удельной активностью, способностью работать в условиях желудочно-кишечного тракта животных, иметь устойчивость к кратковременному действию высоких температур при гранулировании комбикормов (60–80 °С).

В настоящее время фитазы получают микробиологическим синтезом. Все чаще для создания промышленных штаммов-продуцентов используют

дрожжи *Pichia pastoris*. Они обладают мощными системами экспрессии генов и секреции рекомбинантных белков.

В промышленности получили использование фитазы как грибного, так и бактериального происхождения. Грибные фитазы характеризуются высокой термостабильностью, но низкими значениями удельной активности. Удельные активности грибных фитаз составляют от 23 до 196 ед/мг белка [2]. Фитаза из *Aspergillus fumigatus* сохраняет 90% активности при 100 °С в течение 20 мин, но значение ее удельной активности составляет 43 ед/мг белка [3]. В настоящее время все чаще в коммерческих препаратах используют бактериальные фитазы из-за их высокой удельной активности. Однако при температурах >70 °С

*Список сокращений:* среда LB – лизогенный бульон (богатая среда для роста культур бактерий); среда YPD – дрожжевой экстракт пептон декстроза (ростовая среда, содержащая 20 г/л глюкозы); GАР – промотор глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы.

термостабильность бактериальных фитаз низкая и требует модификации. Таким образом, актуальной задачей становится получение бактериальных фитаз с повышенной термостабильностью.

Фитаза из *Citrobacter freundii* имеет высокий потенциал для промышленного применения благодаря ее устойчивости к действию пепсина и трипсина, высокой удельной активности (2770 ед/мг), способности работать при рН и температуре, соответствующих физиологическим условиям пищеварительного тракта животных. Однако термостабильность фермента низкая, он практически полностью инактивируется при воздействии температуры 80 °С в течение 10 мин [4].

Существуют различные подходы к увеличению термостабильности белков: направленная эволюция (методы «допускающей ошибки» ПЦР, «ДНК-шаффлинга»), полурациональный дизайн (создание консенсусных последовательностей, метод сайт-насыщающего направленного мутагенеза), рациональный дизайн (метод сайт-направленного мутагенеза) [4–7]. Так, используя стратегию направленной эволюции, методом «допускающей ошибки» ПЦР получена мутантная рекомбинантная фитаза *E. coli* с увеличением термостабильности при 80 °С на 20% [8] и на 23,3% при 85 °С [9]. Однако данный подход требует создания очень больших библиотек мутантных генов, и, обычно, с этой целью используют экспрессионную систему *E. coli*, и только после отбора перспективных вариантов их тестируют в системе дрожжей *P. pastoris*.

Рациональный и полурациональный дизайн позволяют тестировать мутантные формы ферментов сразу в дрожжах *P. pastoris* [10].

Рациональный дизайн дает хорошие результаты, когда известна пространственная структура фермента. Этот подход зависит от точности предсказаний аминокислотных замен в определенных сайтах с использованием специализированных биоинформационных ресурсов. Так, удалось повысить термостабильность фитаз AppA *E. coli* и PhxA *Aspergillus niger*, для которых известна третичная структура [11–14]. Однако для фитазы из *C. freundii* пространственная структура не известна.

Полурациональный дизайн представляет комбинацию методов направленной эволюции и рационального дизайна и основан на случайном мутагенезе сайтов-мишеней, выбранных в ходе теоретических исследований. Он дает неплохие результаты по увеличению термостабильности белков, третичная структура которых не известна. В настоящее время для изучения таких ферментов применяются методы компьютерного моде-

лирования, которые позволяют понять пространственное положение аминокислотных остатков в молекуле белка. Так, основываясь на гомологии аминокислотных последовательностей фитаз из *Citrobacter braakii*, *Hafnia alvei* и *E. coli*, была смоделирована пространственная модель фитазы из *C. braakii*, что позволило выбрать сайты для мутагенеза и получить термостабильный фермент [15]. В лаборатории авторов, используя принципы полурационального конструирования, на основе фитазы из *C. freundii* был получен мутантный вариант фермента с аминокислотными заменами V41D/K46M/P128S, термостабильность которого возросла на 32% по сравнению с исходным значением [4].

Основываясь на анализе пространственной структуры, можно выделить общие факторы, определяющие стабильность белков [16–18] – это количество водородных связей и ионных взаимодействий, снижение конформационной деформации, улучшение упаковки гидрофобного ядра. Влиять на приведенные выше факторы возможно путем замен аминокислотных остатков, расположенных только в значимых регионах пространственной структуры ферментов [17]. Поиск таких аминокислотных остатков и регионов для конкретных ферментов с целью увеличения их термостабильности является актуальной задачей.

Цель настоящей работы состояла в улучшении термостабильности фитазы из *C. freundii* путем полурационального конструирования (аминокислотные замены введены методом сайт-направленного насыщающего мутагенеза).

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Реактивы

Триптон, пептон, дрожжевой экстракт, глюкоза были получены от компании «ДиаЭМ» (Россия), все ферменты для молекулярных работ – от фирмы Fermentas (Литва), фитат натрия – от Sigma (Швейцария), соли и другие реагенты (реактивы отечественного производства марки хч или чда) – от фирмы «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 необходимо, добавляли ампициллин (Sigma, США) в концентрации 100 мкг/мл.

Штамм *P. pastoris* (*his4-*) ВКПМ У-2837 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 в концентрации 20 г/л.

Для отбора трансформантов *P. pastoris* использовали минимальную среду М9 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; глюкоза – 20; витамины и микроэлементы [19].

**Сайт-направленный насыщающий мутагенез**

Мутации в гене *phyA-C3* [4], кодирующем фитазу PhyA-Cf3, получали методом сайт-направленного насыщающего мутагенеза [20] с помощью мегапраймеров ПЦР в две стадии. Сначала амплифицировали фрагменты гена с необходимыми мутациями для замены аминокислотного остатка в положении 116 зрелой части белка, используя соответствующие пары праймеров PhyCf-t-F/PhyCfmod-t-R и PhyCfmod-t-F/PhyCf-t-R (табл. 1), где «ppp» соответствует кодону одной из 19 аминокислот. Далее полученные фрагменты разделяли гельэлектрофоретически, очищали и использовали в качестве мегапраймеров для ПЦР-синтеза целых ДНК-последовательностей, включая соответствующую пару внешних праймеров PhyCf-t-F, PhyCf-t-R (табл. 1). Полученные таким образом мутантные гены клонировали, трансформировали и экспрессировали в дрожжах *P. pastoris*.

**Конструирование экспрессионных интегративных плазмид, получение трансформантов**

Для конструирования плазмид использовали экспрессионный вектор pP10 [21], содержащий в своем составе конститутивный промотор GAP, сигнал секреции α-фактор дрожжей *S. cerevisiae*, селективный маркер *HIS4*. Мутантные гены расщепляли эндонуклеазами рестрикции по сайтам *EcoRI* и *NotI* и клонировали в вектор pP10.

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*) проводились в соответствии с методиками [22]. Выделение хромосомной ДНК проводили с использованием комплекта реagens для экспресс-выделения ДНК «ДНК-экспресс» («Синтол», Россия). Присутствие соответствующих мутаций проверяли секвенированием.

Полученные рекомбинантные плазмиды расщепляли эндонуклеазой рестрикции *BglII* и трансформировали в клетки *P. pastoris*, согласно протокола Kit #28662 (Invitrogen). Трансформанты отбирали по способности расти на минимальной среде М9 без источника гистидина. Наличие интеграционной кассеты в составе хромосомы трансформантов определяли методом ПЦР с использованием праймеров PhyCf-t-F, PhyCf-t-R (табл. 1).

**Отбор трансформанта, продуцирующего мутантную фитазу с повышенной термостабильностью**

Трансформанты помещали в 96-луночные планшеты с ростовой средой YPD, содержащей 20 г/л глюкозы, и выращивали в термостатируемом шейкере при 28 °С и 250 об/мин в течение 48 ч. Из каждой лунки отбирали аликвоты и переносили в другие 96-луночные планшеты, подходящие для прогрева при 80 °С в течение 10 мин в приборе Mastercycler gradient 5331 (Eppendorf). Прогретые планшеты охлаждались при 4 °С в течение 30 мин. Далее репликатором часть жидкости из прогретых и соответствующих непрогретых планшетов переносили на квадратные чашки, содержащие твердую агаризованную среду следующего состава: 1,5% агарозы, 1% фитата Na и 0,5% CaCl<sub>2</sub>, 0,2 М ацетатный буфер pH 4,5. Термостабильность фитаз оценивали, исходя из сравнения интенсивности и размера зоны просветления вокруг мест нанесения прогретой и непрогретой культуральной жидкости, содержащей фитазы.

Таблица 1

**Праймеры, использованные в работе**

**Primers used in the work**

Праймер	Последовательность (5'→3')
PhyCf-t-F	aggaattcgaagagcagaacgggtatgaaact
PhyCf-t-R	agcggccgctatttcgtaactgcacactc
PhyCfmod-t-F	caagtgcattatcagnnngatga
PhyCfmod-t-R	tttctcatcnnnctgataat

## Ферментация отобранного трансформанта

Для получения инокулята трансформанты 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 20 г/л глюкозы, в соотношении 1:10, и выращивали при 28 °С в течение 48 ч. Отбирали аликвоту, клетки осаждали центрифугированием, супернатант анализировали на наличие фитазной активности.

## Выделение и очистка мутантной фитазы с повышенной термостабильностью

Культуральную жидкость центрифугировали при  $g$  14000 в течение 10 мин. К супернатанту добавляли равный объем 0,5М глицин-HCl буфера (рН 2,0) 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 отсеивания 30 кДа и разбавляли 10 мМ натрий ацетатным буфером рН 4,5. Полученный раствор наносили на катионообменную колонку HiTrap SP 5мл (GE Healthcare, Швеция), предварительно уравновешенную 10 мМ натрий ацетатным буфером рН 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. Концентрацию очищенного белка определяли методом Бредфорда с использованием, согласно инструкции, набора фирмы ДиаЭМ (Россия) и бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта (ДиаЭМ).

## Определение фитазной активности

Фитазную активность определяли по накоплению в реакционной смеси свободного фосфат-иона, детектируемого модифицированным методом Фиске–Субарроу [23]. 100 мкл раствора фермента (супернатанта) инкубировали с 900 мкл раствора субстрата (2% фитата натрия в 0,2 М ацетатном буфере, рН 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% (об.) серной кислоты и одного объема 2,5%-ного водного раствора сульфата железа (II)) и измеряя оптическую плотность раствора при 700 нм на спектрофотометре Versamax read-

er (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). За единицу фитазной активности принимали количество фермента, способного высвободить 1 мкмоль неорганического фосфата из фитата натрия в 1 мин.

## Определение свойств и кинетических характеристик мутантной фитазы

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

Для определения температурного оптимума ферментативная активность измерялась в интервале температур от 35 до 60 °С.

Для определения термостабильности фермента, культуральную жидкость, содержащую фитазу, прогревали при различных температурах в интервале 45–80 °С в течение 10 мин. и затем охлаждали 30 мин для ренатурации белков. Остаточную фитазную активность измеряли при 37 °С при рН 4,0 и сравнивали с активностью контроля – образца, не подвергнувшегося действию высоких температур.

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 измерения проводились независимо в трех повторностях ( $P < 0,05$ ).

## Структурный анализ мутантной фитазы

Моделирование трехмерных структур фитаз PhyA-Cf3 и PhyCf-t осуществляли с помощью сервера SWISS MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>). Структурный анализ пространственных моделей фитаз проводили с использованием программы Swiss-PdbViewer 3.7.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Выбор сайта для проведения мутагенеза

Данные о пространственной структуре и аминокислотных последовательностях белков позволяют успешно выбирать сайты для проведения сфокусированного мутагенеза и изменять термостабильность ферментов [24].

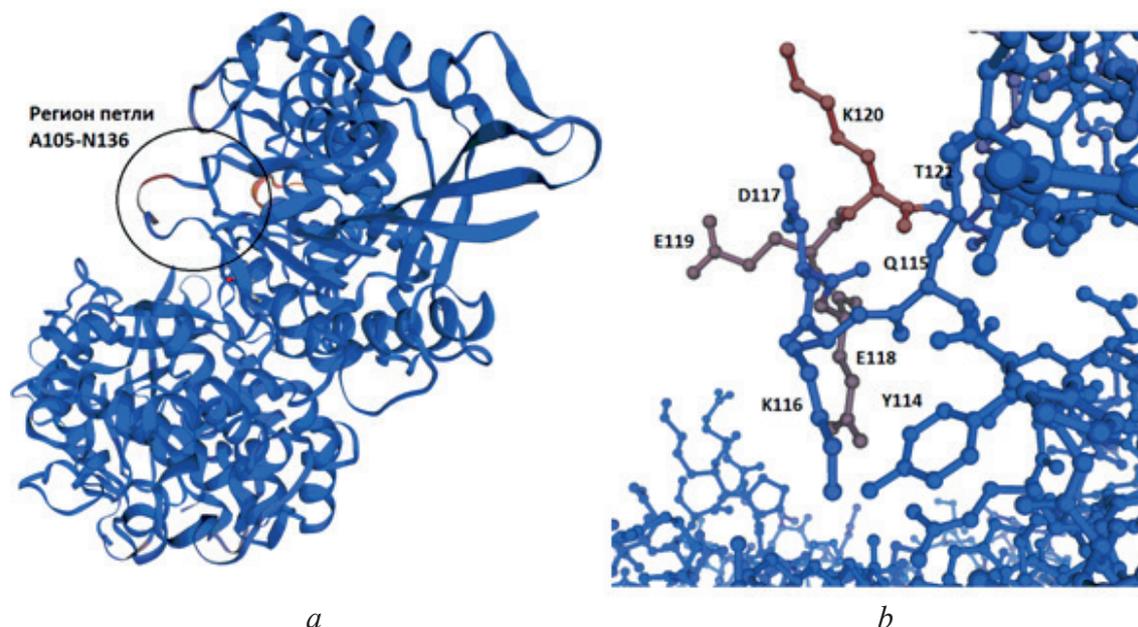
В качестве исходной матрицы для определения сайта-мишени была выбрана полученная ранее в нашей лаборатории мутантная фитаза PhyA-Cf3, сконструированная путем введения замены K46M (в зрелой части белка положение 24) в аминокислотную последовательность фитазы PhyA-Cf из

*C. freundii*, которая привела к увеличению термостабильности фермента PhyA-Cf3 на 12% по сравнению с нативным [4]. С помощью сервера SWISS-MODEL была построена пространственная модель фермента PhyA-Cf3 (рис. 1a) и определены области, соответствующие петлям, расположенным на поверхности белка (рис. 1b). Матрицей для построения послужила 3D структура высокоомологичной (98%) фитазы из *C. braakii*.

Все большее число исследований показывают, что потенциальными сайтами, изменения в которых приводят к повышению термостабильности белка, являются области с нерегулярной структурой, особенно «флуктуирующие петли» [25–27]. Считается, что подвижные регионы имеют относительно малое количество контактов с другими аминокислотами, поэтому большие флуктуации внутри таких областей, вызванные нагреванием, потенциально могут способствовать проникновению воды в гидрофобное ядро белка, вызывая его денатурацию. Экспериментальные исследования и данные компьютерного моделирования показывают, что стабилизация флуктуирующих регионов внутри белковой глобулы не оказывает существенного влияния на ее устойчивость к нагреванию [28]. Петли с высокой степенью флуктуации, как правило, обнаруживаются на поверхности белка, тогда как петли, расположенные внутри белковой глобулы, имеют тенденцию к меньшей подвижности.

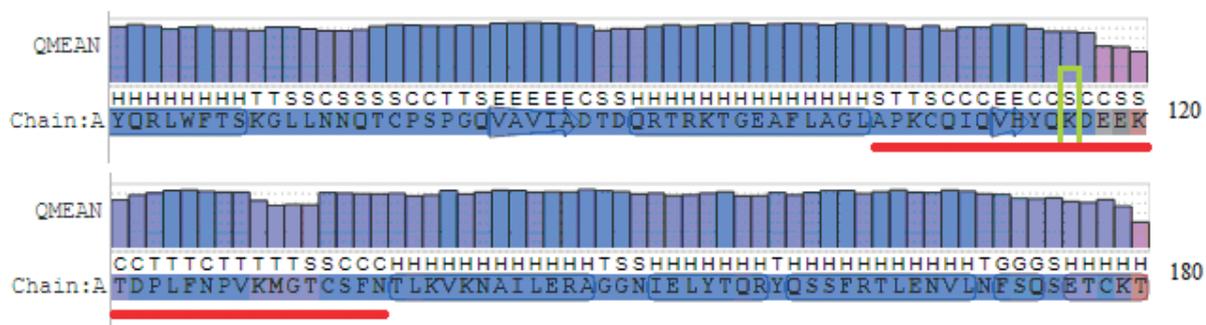
Было показано, что в процесс частичного разворачивания белка прямо вовлекаются регионы, расположенные на поверхности, влияя на кинетическую стабильность [29]. Большая часть поверхностных аминокислотных остатков не принимает непосредственного участия в каталитической активности, и поэтому поверхностные мутации, обычно, не оказывают существенного влияния на удельную активность ферментов. Таким образом, петли, расположенные на поверхности белка, могут служить хорошими мишенями для получения термостабильных ферментов методами белковой инженерии.

Для проведения мутагенеза была выбрана область петли A105–N136 зрелой части фитазы PhyA-Cf3, расположенная на поверхности белка (рис. 1). Петли представляют собой разнообразный класс структур, включающий как четко определенные витки, так и более неупорядоченные случайные клубки «coil». Регион A10–N136 представляет подвижную петлю, доступную для сольватации в области E119–K120, которая содержит неупорядоченные случайные клубки «coil» и изобилует поворотами и изгибами (рис. 2). Для проведения сайт-направленного насыщающего мутагенеза был выбран аминокислотный остаток лизина в положении 116 зрелой части белка (K116) (рис. 1b), так как он располагается в области петли с высоко неупорядоченной структурой «coil» и изгиба, образованного без участия водородной связи (рис. 2).



**Рис. 1.** 3D структура фермента PhyA-Cf3, построенная с помощью сервера SWISS-MODEL. *a* – пространственная модель; *b* – область петли в белковой глобуле

**Fig. 1.** The 3D structure of the PhyA-Cf3 creating by SWISS-MODEL: (*a*), the protein model; (*b*), he loop region in the protein globule



**Рис. 2.** Элементы вторичных структур области A105–N136 (подчеркнута красным цветом), предсказанные с использованием сервера SWISS-MODEL. H –  $\alpha$ -спираль; T – неспецифический поворот, образованный водородной связью; G – трехвитковая спираль; E – «складка», параллельная или антипараллельная  $\beta$ -листу; C – неупорядоченный случайный клубок «coil»; S – изгиб, образованный без участия водородной связи. Рамкой выделен K116

**Fig. 2.** Secondary structural elements of A105 – N136 (red underline), predicted by SWISS-MODEL: H – right-handed  $\alpha$ -helix; T – hydrogen bonded unspecified turn; G – 3-turn helix; E – extended strand in parallel and/or anti-parallel  $\beta$ -sheet conformation; C – coil, residues which are not in any of the above conformation; S – bend, the only non-hydrogen-bond based assignment; K116 is in square

### Сайт-направленный насыщающий мутагенез, отбор фитазы с повышенной термостабильностью

Одним из методов, позволяющим вводить мутации в выбранный сайт и с успехом генерировать нуклеотидные последовательности с заданными мутациями является сайт-направленный насыщающий мутагенез [30].

Были получены мутантные последовательности гена *phyA-C3*, кодирующего фитазу PhyA-Cf3 и клонированы в интегративный экспрессионный вектор pP10 [21] под контролем конститутивного GAP-промотора. Для секреции фермента в культуральную жидкость в векторе предусмотрен сигнальный пептид, представляющий из себя пре-про-последовательность  $\alpha$ -фактора дрожжей *S. cerevisiae*. Были сконструированы плазмиды, которые расщепляли эндонуклеазой рестрикции *Bgl*III и получали экспрессионные кассеты, которыми трансформировали дрожжи *P. pastoris*. Полученные трансформанты выращивали в плашках в жидкой питательной среде YPD с 2%-ной глюкозой в течение 48 ч. Скрининг ферментов с повышенной термостабильностью проводили с помощью чашечного теста [4] на среде с фитатом кальция.

В результате проведенного скрининга был отобран единственный клон, продуцирующий фитазу PhyCf-t с повышенной термостабильностью. Секвенирование нуклеотидной последовательности показало, что в результате мутаций в триплексе, кодирующем лизин, произошла замена K116E в аминокислотной последовательности зрелой части белка. Таким образом, полученная мутант-

ная аминокислотная последовательность отличалась от нативной последовательности фитазы из *C. freundii* заменами K46M/K138E (K24/K116E для зрелой части белка).

### Очистка и характеристика рекомбинантной фитазы PhyCf-t

Рекомбинантная фитаза PhyCf-t была очищена в два этапа: на первом белки осаждали путем подкисления культуральной жидкости до pH 2, что не оказывало влияния на фермент благодаря его кислотоустойчивости; на втором этапе белок был очищен до электрофоретической однородности методом катионообменной хроматографии.

Удельные активности и кинетические характеристики очищенного нативного (PhyA-Cf) [4] и мутантного (PhyCf-t) ферментов представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, удельная активность PhyCf-t уменьшилась незначительно (~17%), значение константы Михаэлиса не изменилось, несколько увеличилась эффективность катализа. Таким образом, мутантный фермент PhyCf-t существенно не изменил свои промышленно-ценные характеристики.

### Оптимальный pH

Была изучена активность рекомбинантной фитазы PhyCf-t при различных значениях pH (рис. 3).

Как видно из рис. 3а, оптимальное значение pH для работы фермента PhyCf-t не изменилось и наблюдалось при значении 4,0. Однако было обнаружено сужение рабочего интервала pH. Аналогичное изменение рабочего интервала pH наблюдалось

## Сравнение характеристик ферментов

## Comparison of enzyme characteristics

Фитаза	$K_m$ , мкМ	$k_{кат}$ , мин <sup>-1</sup>	$k_{кат}/K_m$ , мин <sup>-1</sup> мкМ <sup>-1</sup>	$U$ , ед/мг
PhyA-Cf	254,77±14,53	99,7±3,52	391±24	2770±8
PhyCf-t	248,32±12,11	107±2,06	431±16	2303±10

Примечание:  $K_m$  – константа Михаэлиса;  $k_{кат}$  – константа катализа;  $U$  – удельная активность;  $k_{кат}/K_m$  – эффективность катализа.

Note:  $K_m$  – Michaelis constant;  $k_{кат}$  – reaction rate constant;  $U$  – specific activity;  $k_{кат}/K_m$  – catalysis efficiency.

у мутантных термостабильных фитаз AppA2 *E. coli* K46E и K65E/K97M/S209G, остаточная фитазная активность которых после прогрева при 80 °С в течение 10 мин составляла 60% [8]. Подобный эффект был обнаружен у мутантной термостабильной фитазы из *C. freundii* V41D/K46M/P128S [4].

Свойство фитазы PhyCf-t гидролизовать фитат в кислых условиях с оптимумом pH 4,0 позволит ей эффективно работать в гастроэнтеральном тракте животных [1, 31].

## Температурный оптимум и термостабильность

Как видно из графика (рис. 3b), температурный профиль фитазы PhyCf-t изменился не значительно, оптимум наблюдался при 50 °С. Известно, что физиологическая температура свиней составляет около 39 °С [32], а бройлеров – 42 °С [33]. Из графика, представленного на рис. 3b, видно, что при 40 °С фитаза PhyCf-t проявляет более 70% от максимальной активности. Таким образом, предполагается, что фермент PhyCf-t будет эффективно работать в организме животных.

Была изучена термостабильность рекомбинантной фитазы PhyCf-t. Как видно из графика на рис. 4, фитаза PhyCf-t сохраняла более 60% активности после прогрева при 60 °С. После инкубации в течение 10 мин при 80 °С мутантный фермент PhyCf-t сохранял 38% от исходной активности, в то время как фермент дикого типа PhyA-Cf – 3% активности. Таким образом, по сравнению с ферментом дикого типа, фитаза PhyCf-t показала 35%-ное увеличение термостабильности.

## Структурный анализ мутантной фитазы

С помощью сервера SWISS-MODEL была смоделирована пространственная структура фитазы PhyCf-t и выделена область петли, включающая мутацию K116E. Используя программу Swiss-PdbViewer 3.7, для фитаз PhyA-Cf3 и PhyCf-t были предсказаны конформационные изменения и возможные водородные связи в области петли Q115–T121 зрелой части белка (рис. 5).

Как видно из рис. 5a, остаток лизина в 116 позиции фитазы PhyA-Cf3 не образует водородных

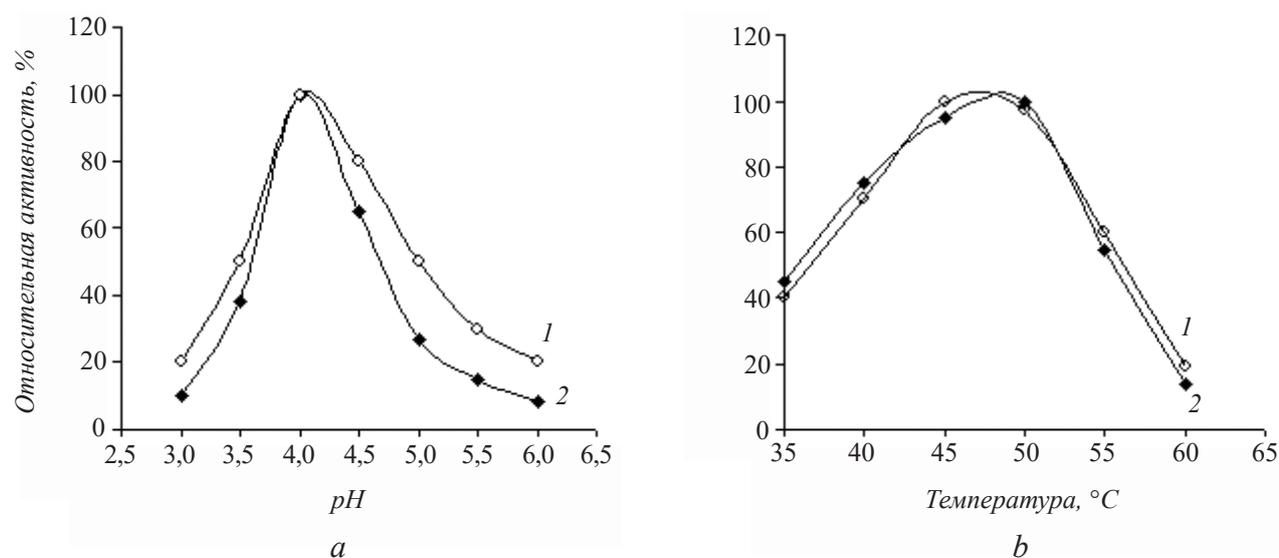


Рис. 3. Активность фитаз при различных значениях pH (a) и температуры (b). 1 – PhyA-Cf (нативная), 2 – PhyCf-t (мутантная)

Fig. 3. Activity of phytases at various pH (a) and temperatures (b). 1 – PhyA-Cf, 2 – PhyCf-t

связей с другими аминокислотами. Замена K116 на глутаминовую кислоту привела к формированию новой водородной связи между E116 и глутаминовой кислотой в 118 позиции. Водородная связь между T121 и M130, находящаяся в PhyA-Cf3, оказалась разорванной в фитазе PhyCf-t, однако, возникла новая водородная связь между остатком треонина 121 и пролином в 123 позиции.

В настоящее время известно, что термостабильность фермента находится в прямой зависимости от количества водородных связей в молекуле [5]. Так, замены K65E и G344D в фитазе AppA2 *E. coli* привели к образованию новых водородных связей и увеличению термостабильности фермента [8]. Также было продемонстрировано, что кислотные остатки E65 и D344 расположены в области петли на поверхности белка. В работе Xiang et al. было показано, что критическими областями для термостабильности фитазы из *A. fumigatus* также являются регионы поворотов и/или петель, расположенные на поверхности белка и вовлеченные в рефолдинг [34]. Кроме того, фитаза из *A. fumigatus* является более термостабильной, чем фитаза из *A. niger* благодаря наличию в ее молекуле большего количества водородных связей и солевых мостиков, образованных кислотными остатками [34].

Таким образом, формирование новых водородных связей между E116–E118 и T121–P123 могло оказать существенное влияние на термостабильность фитазы PhyCf-t.

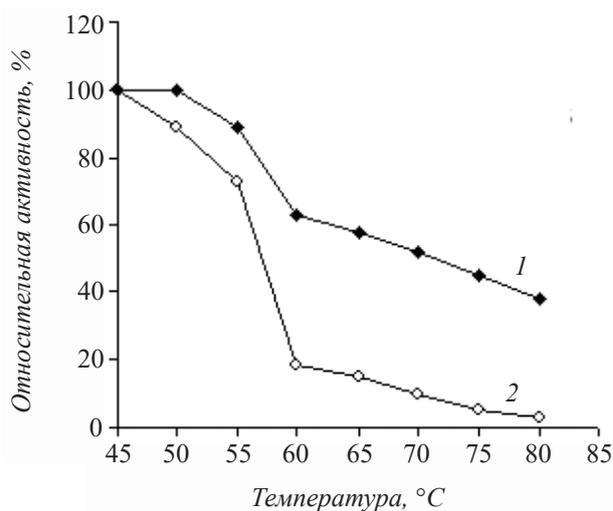


Рис. 4. Остаточная фитазная активность после прогрева при различных температурах в течение 10 мин. 1 – PhyA-Cf, 2 – PhyCf-t

Fig. 4. Residual phytase activity after heating at various temperatures for 10 min. 1 – PhyA-Cf, 2 – PhyCf-t

Глутаминовая кислота является высокополярным соединением и способна участвовать в формировании солевых мостиков. Влияние введения дополнительных солевых мостиков в глобулу фитазы AppA *E. coli* на ее термостабильность было отмечено в работах [35, 36]. Можно предположить, что остаток глутаминовой кислоты в 116 позиции фитазы PhyCf-t может также участвовать в

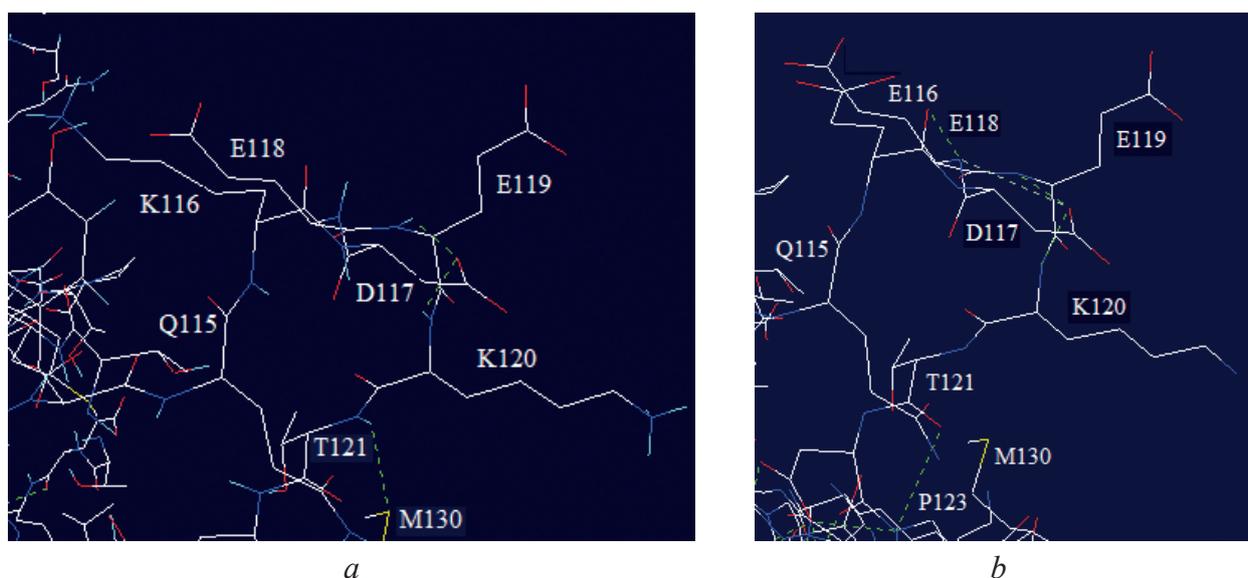


Рис. 5. Предсказанные пространственные структуры области петли Q115–T121 для фитазы PhyA-Cf3 (a) и мутантной PhyCf-t (b). Красным цветом отмечены атомы кислорода, синим – атомы азота, зеленой пунктирной линией отмечены предсказанные водородные связи

Fig. 5. Structural prediction in the loop Q115–T121 residual interactions for PhyA-Cf3 (a) and PhyCf-t (b). Red color – atoms of oxygen, blue – atoms of nitrogen, green dotted lines represent the hydrogen bond interactions

формировании нового солевого мостика в молекуле и оказывать влияние на перераспределение электронной плотности, улучшая термостабильность фермента посредством стабилизации локальных взаимодействий между аминокислотными остатками в молекуле белка.

Итак, в ходе работы была значительно улучшена термостабильность фитазы из *C. freundii* путем введения методом сайт-направленного насыщающего мутагенеза замены K138E в дополнение к мутации K46M. Была показана существенная роль аминокислотной замены в регионе петли с высоко неупорядоченной структурой «coil», расположенной на поверхности глобулы, в изменении термостабильности фермента.

Работа выполнена при финансовой государственной поддержке в лице Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI57917X0145) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

## ЛИТЕРАТУРА

- 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
- Wyss M., Brugger R., Kronenberger A., et al. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65(2), 367–373.
- Rodriguez E., Mullaney E.J., Lei X.G. Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, 268, 373–378. doi: 10.1006/bbrc.2000.2121
- Гордеева Т.Л. Разработка молекулярно-генетических подходов для оптимизации промышленно-важных характеристик фитазы *Citrobacter freundii*. Автореферат ... к.б.н., ГосНИИгенетика, Москва. 2010, 24.
- Alcalde M. Directed enzyme evolution: Advances and Applications. *Springer International Publishing AG*, 2017, 284. doi: 10.1007/978-3-319-50413-1
- Chen C.C., Cheng K.J., Ko T.P., Guo R.T. Current Progresses in Phytase Research: Three-Dimensional Structure and Protein Engineering. *ChemBioEng Rev.*, 2015, 2(2), 76–86. doi: 10.1002/cben.201400026
- Yang H., Liu L., Li J., et al. Rational Design to Improve Protein Thermostability: Recent Advances and Prospects. *ChemBioEng Rev.*, 2015, 2(2), 87–94. doi: 10.1002/cben.201400032
- Kim M.S., Lei X.G. Enhancing thermostability of *Escherichia coli* phytase AppA2 by error-prone PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 79(1), 69–75. doi: 10.1007/s00253-008-1412-7
- Zhu W., Qiao D., Huang M., et al. Modifying thermostability of AppA from *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.*, 2010, 61, 267–273. doi: 10.1007/s00284-010-9606-5
- Hesampour A., Siadat S.O.R., Malboobi M. A., et al. Improvement of phytase thermostability and catalytic efficiency by site-directed mutagenesis for industrial application. *J. Biotechnol. Biomater.*, 2015, 5(2), 46. doi: 10.4172/2155-952X.S1.031
- Wu T.H., Chen C.C., Cheng Y.S., et al. Improving specific activity and thermostability of *Escherichia coli* phytase by structure-based rational design. *J. Biotechnol.*, 2014, 175, 1–6. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.01.034
- Han N., Miao H., Yu T., et al. Enhancing thermal tolerance of *Aspergillus niger* PhyA phytase directed by structural comparison and computational simulation. *BMC Biotechnol.*, 2018, 18(1), 36. doi: 10.1186/s12896-018-0445-y
- Fakhravar A., Hesampour A. Rational design-based engineering of a thermostable phytase by site-directed mutagenesis. *Mol. Biol. Rep.*, 2018, 8, 1–9. doi: 10.1007/s11033-018-4362-x
- Zhang J., Liu Y., Gao S., et al. Site-directed mutagenesis and thermal stability analysis of phytase from *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. Res. Comm.*, 2016, 9(3), 357–365.
- Sanchez-Romero I., Ariza A., Wilson K.S., et al. Supporting Information S1 and S2: Mechanism of Protein Kinetic Stabilization by Engineered Disulfide Crosslinks. *PLOS ONE*, 2013, 8, e70013.
- Kumar S., Tsai C.J., Nussinov R. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng.*, 2000, 13, 179–191.
- Querol E., Perez-Pons J.A., Mozo-Villarias A. Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability. *Protein Eng.* 1996, 9, 265–271.
- Ragone R. Hydrogen-bonding classes in proteins and their contribution to the unfolding reaction. *Protein Sci.*, 2001, 10(10), 2075–82. doi: 10.1110/ps.09201
- Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификации дрожжей. *Пищевая промышленность*, 1979, 48.
- David E., Hill D.E., Oliphant A.R., Struhl K. Mutagenesis with degenerate oligonucleotides: An efficient method for saturating a defined DNA region with base pair substitutions. *Meth Enzymol.*, 1987, 155, 558–568. doi: 10.1016/0076-6879(87)55036-4
- Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Бавыкина Н.Б. и др. Интегративный плазмидный вектор для экспрессии генов в дрожжах. Патент РФ 2388823 Опубл. 10.05.2010. Бюл. №13
- 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

24. Yu H., Yan Y., Zhang C., et al. Two strategies to engineer flexible loops for improved enzyme thermostability. *Scientific Reports*, 2017, 7, 41212. doi: 10.1038/srep41212
25. Morris P., Rios-Solis L., Garcia-Arrazola R., et al. Impact of cofactor-binding loop mutations on thermotolerance and activity of *E. coli* transketolase. *Enzyme Micro. Technol.*, 2016, 89, 85–91.
26. Nestl B.M., Hauer B. Engineering of Flexible Loops in Enzymes. *ACS Catalysis*, 2014, 4, 3201–3211. doi: 10.1021/cs500325p
27. Yu H., Huang H. Engineering proteins for thermostability through rigidifying flexible sites. *Biotechnology Advances*, 2014, 32, 308–315. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.10.012
28. McClelland L.J., Bowler B.E. Lower Protein Stability Does Not Necessarily Increase Local Dynamics. *Biochemistry*, 2016, 55, 2681–2693. doi: 10.1021/acs.biochem.5b01060
29. Eijssink V.G.H., Gaseidnes S., Borchert T.V., van den Burg B. Directed evolution of enzyme stability. *Biomolecular Engineering*, 2005, 22, 21–30. doi: 10.1016/j.bioeng.2004.12.003
30. Reetz M.T., Carballeira J.D., Vogel A. Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angewandte Chemie*, 2006, 45, 7745–7751. doi: 10.1002/anie.200602795
31. 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*, Karlsruhe Ittingen. 1993, 202–205.
32. 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. *Biotechnology Reports.*, 2018, 17, 49–54. doi: 10.1016/j.btre.2017.12.004
33. 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. doi: 10.1590/S1516-35982008000800018
34. Xiang T., Liu Q., Deacon A.M., et al. Crystal structure of a heat-resilient phytase from *Aspergillus fumigatus*, carrying a phosphorylated histidine. *J. Mol. Biol.*, 2004, 339:437–445. doi: 10.1016/j.jmb.2004.03.057
35. Fei B., Xu H., Zhang F., et al. Relationship between *Escherichia coli* AppA phytase's thermostability and salt bridges. *J. Biosci. Bioeng.*, 2013, 115(6), 623–7. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.12.010
36. Strickler S.S., Gribenko A.V., Gribenko A.V., et al. Protein stability and surface electrostatics: a charged relationship. *Biochemistry*, 2006, 45(9), 2761–2766. doi: 10.1021/bi06001

## Increase in Thermal Stability of Phytase from *Citrobacter freundii* by Site-Directed Saturation Mutagenesis

T.L. GORDEEVA<sup>1,\*</sup>, L.N. BORSHCHEVSKAYA<sup>1</sup>, A.N. KALININA<sup>1</sup>, S.P. SINEOKY<sup>1</sup>, M.D. KASHIRSKAYA<sup>2</sup>, and S.P. VORONIN<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-stock Venture Bioamide, 410033, Saratov Russia

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

Received October 12, 2018

Revised November 13, 2018

Accepted December 15, 2018

**Abstract**—Phytases are widely used to improve the mixed fodder properties. Due to its high specific activity, a PhyA-Cf phytase from *Citrobacter freundii* is of special interest for agrobiotechnology. In order to decrease the thermal sensitivity of the enzyme during the fodder granulation at 60–80 °C, the thermal stability of the phytase was enhanced by the method of site-directed saturation mutagenesis. The mutant genes were cloned in a pP10 vector under the control of the GAP promoter and expressed in the cells of *Pichia pastoris* yeast. A mutant variant of the enzyme, K46M/K138E, showed a 35% increase in the thermal stability (10 min at 80 °C) as compared to phytase from the wild type strain. The analysis of the 3D model of the enzyme showed that the substitution of K138E located at the enzyme surface in the region of a loop with a highly irregular structure (so-called *coil*) exerted a significant effect on changing the protein thermal stability. It was shown that the introduced mutations had no noticeable effect on the industrially valuable enzyme characteristics including specific activity, temperature and pH profiles.

**Key words:** phytase from *Citrobacter freundii*, thermal stability, *Pichia pastoris* yeast, site-directed saturation mutagenesis.

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

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-6-33-42