

УДК 577.151.6

## Экспрессия $\beta$ -маннаназы *Aspergillus aculeatus* в дрожжах *Pichia pastoris* и анализ промышленно-ценных свойств фермента

© 2019 М.Г. ТАРУТИНА<sup>1,\*</sup>, М.Н. ЛАЗАРЕВА<sup>1</sup>, Е.И. СЕМЕНКО<sup>1</sup>, С.П. СИНЕОКИЙ<sup>1</sup>

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

\*e-mail: m\_tarutina@mail.ru

Поступила в редакцию 08.11.2018 г.

После доработки 28.11.2018 г.

Принята к публикации 15.01.2019 г.

Впервые продемонстрирована эффективная экспрессия гена *man1*,  $\beta$ -1,4-маннаназы *Aspergillus aculeatus*, в дрожжах *Pichia pastoris*, а также подтверждены промышленно-ценные свойства синтезируемой маннаназы.  $\beta$ -Маннаназы являются ферментами промышленного назначения и используются, в частности, в кормовой промышленности. Наиболее значимые требования, предъявляемые к кормовым ферментам – это широкий рН-диапазон действия, термостабильность и высокая удельная активность. Полученные результаты позволяют считать использование гена *man1* *A. aculeatus* перспективным для создания промышленных продуцентов маннаназ на основе дрожжей *Pichia pastoris*.

**Ключевые слова:** рекомбинантная  $\beta$ -маннаназа, *Pichia pastoris*, *Aspergillus aculeatus*, сверхэкспрессия

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-1-38-44

Маннаназы являются ферментами промышленного назначения и применяются в целлюлозно-бумажной и пищевой промышленности (растворимый кофе, диетические пищевые продукты), в производстве синтетических моющих средств. Одной из областей применения  $\beta$ -1,4-маннаназ является кормовая промышленность. В составе кормов наряду с такими некрахмалистыми полисахаридами (НПС) как  $\beta$ -глюканы, ксиланы, пектины присутствуют и маннаны. Содержание маннанов в структуре НСП основных кормов (зерновые, подсолнечный жмых, соевый шрот) колеблется от 0,3 до 1,5%, а нетрадиционных кормов (нешелушенные ячмень и подсолнечник и др.) может достигать 3,2–9,7% [1]. Наличие маннанов в кормах приводит к повышению вязкости содержимого желудочно-кишечного тракта птицы и животных с однокамерным желудком из-за способности маннанов связывать свободную воду. Введение в корм животных  $\beta$ -маннаназ способствует как повышению питательной ценности корма, так и снижению его вязкости.

$\beta$ -1,4-маннаназа ( $\beta$ -маннаназа, Е.С. 3.2.1.78) относится к семейству О-гликозилгидролаз и катализирует неупорядоченный гидролиз  $\beta$ -1,4-гликозидных связей в основной полимерной цепи молекулы маннана [2]. Маннаны – полисахариды, входящие в состав гемицеллюлозной фракции клеточной стенки растений. Они составляют значительную часть растительного сырья. К маннанам – деградирующим ферментам – кроме  $\beta$ -маннаназ, относятся  $\beta$ -маннозидаза (ЕС 3.2.1.25) и  $\beta$ -глюкозидаза (ЕС 3.2.1.21), разрушающие линейный каркас полисахарида [3]. Продуктами расщепления маннанов являются манноолигосахариды и манноза, которые могут усваиваться живыми организмами.

Спектр микроорганизмов, из которых были выделены  $\beta$ -маннаназы, широкий и включает некоторых представителей бактерий, грибов, высших растений, моллюсков и насекомых. Рынок кормовых  $\beta$ -маннаназ представлен преимущественно ферментами бактериального происхождения, но имеются препараты, содержащие маннаназы

Список сокращений: ДНС – динитросалициловая кислота; КЖ – бесклеточная культуральная жидкость; НПС – некрахмалистые полисахариды; среда LB – среда Лурия-Бертани, богатая для роста культур бактерий; среда YNB (Yeast Nitrogen Base) – минимальная среда для дрожжей; ОП – оптическая плотность; LBG – галактоманнан, камедь рожкового дерева (Locust Bean Gum).

мицелиальных грибов. pH-оптимум и оптимум температуры  $\beta$ -манназа большинства мицелиальных грибов находится в диапазоне pH 2,4–7,5 и температур 45–90 °C [2], что наиболее отвечает требованиям, предъявляемым к кормовым ферментам. В процессе перемещения съеденного корма по желудочно-кишечному тракту животного pH меняется, и фермент должен сохранять активность, как при кислых, так и щелочных значениях pH.

Эффективность биотехнологий получения ферментных препаратов в основном определяется продуктивностью используемых рекомбинантных штаммов-продуцентов, которая, в свою очередь, в значительной степени зависит от удельной активности синтезируемого фермента.

Мицелиальные грибы рода *Aspergillus* продуцируют различные маннолитические ферменты, включая  $\beta$ -1,4-манназазы, и поэтому являются источником генов активных манназаз для клонирования. Преимущественно мицелиальные грибы продуцируют  $\beta$ -манназазы, относящиеся к семейству гликозилгидролаз 5 и 26 (GH5 и GH26) [4, 5].  $\beta$ -Манназаза, кодируемая геном *man1* *A. aculeatus* (AAA67426), относится к семейству GH5 [6].  $\beta$ -Манназаза *A. aculeatus* обладает относительно высокой удельной активностью, что определяет перспективность ее использования для создания рекомбинантных промышленных продуцентов.

Из некоторых представителей грибов рода *Aspergillus* были выделены и охарактеризованы  $\beta$ -манназазы, которые сохраняют активность при изменении значений pH от 2 до 8 и в интервале температур 35–70 °C, а также имеют высокое сродство к галактоманнанам.

Ранее  $\beta$ -манназаза *A. aculeatus* из природных штаммов *A. aculeatus* KSM510 или *A. aculeatus* MRC11624 была использована для создания рекомбинантных продуцентов на основе *A. oryzae* [7], *A. niger* D15 [8], дрожжевых штаммов *Saccharomyces cerevisiae* Y294 [6, 9] и *Yarrowia lipolytica* Polh [10] и охарактеризована.

Рекомбинантный штамм *A. oryzae* с геном  $\beta$ -манназазы *A. aculeatus* CBS 101.43 запатентован компанией Novo Nordisk (Дания). Штамм продуцирует фермент с оптимумами pH 5,0 и температуры 60 °C. Он относительно стабилен в диапазоне значений pH 2,5–10,0 и при температурах ниже 70 °C [11].  $\beta$ -Манназаза *A. aculeatus* MRC11624 была запатентована для использования в пищевой промышленности для уменьшения вязкости и усиления экстракции при обработке зерен кофе [12].

В настоящее время все более широкое распространение находят технологии получения различ-

ных ферментов на основе рекомбинантных штаммов дрожжей *P. pastoris*. Дрожжи *P. pastoris* обеспечивают высокий выход биомассы (свыше 130 г сухой биомассы на 1 л) [13] и способны секретировать более 20 г/л гетерологичного белка в среду культивирования [14]. Использование подобных технологий позволяет снизить себестоимость получения ферментных препаратов, а также унифицировать технологическую платформу для промышленного производства различных промышленно-ценных ферментов.

Цель данной работы – экспрессия гена *man1*  $\beta$ -манназазы *A. aculeatus* KSM510 (L35487) в дрожжах *P. pastoris* и характеристика синтезируемой  $\beta$ -манназазы (определение молекулярной массы, активности манназазы в КЖ, количества секретируемого белка, оптимальных значений pH и температуры, стабильности белка в широком диапазоне pH и температур,  $K_m$  и  $V_{max}$ ).

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Штаммы, плазмиды и условия культивирования

Для клонирования и наработки плазмидной ДНК использовали штамм *E. coli* XL1 blue (Stratagene, США). Для экспрессии гена *man1* использовали вектор pPIC9 $\alpha$  и штамм дрожжей *P. pastoris* GS115 (*his4*, *Mut+*) (Invitrogen, США). Экспрессионный вектор pPIC9 $\alpha$  содержал промотор и терминатор гена алкогольоксидазы I (AOX1), селективный маркер *his4* из дрожжей *P. pastoris* и сигнальную последовательность  $\alpha$ -фактора (MF $\alpha$ ) из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Штамм *E. coli* XL1 blue культивировали при 37 °C на среде LB, при необходимости с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл. Штамм *P. pastoris* GS115 растили при 30 °C на комплексной среде YP (дрожжевой экстракт – 1%, пептон – 2%) с глюкозой (2%) или на селективной синтетической среде YNB (HiMedia, Индия) с 1%-ной глюкозой и добавлением гистидина в количестве 20 мкг/мл, при необходимости.

### Конструирование плазмиды

Последовательность нуклеотидов гена *man1*  $\beta$ -манназазы из штамма *A. aculeatus* KSM510 была синтезирована компанией GenScript (США), и была идентична последовательности L35487, за исключением замены С→G в области NotI-сайта, не влияющей на последовательность аминокислот. Ген *man1* *A. aculeatus* размером 1080 пн

амплифицировали с синтезированной последовательности с использованием пары олигонуклеотидов Man-MF-F (5'-GTCTGAATTCCTTCCCCGGACGCCGAACCACAACG-3') и Man-R (5'-CTGCGGCCGCTTACTTCGACTGCGCATTTGATGGCC-3'), содержащих на концах сайты EcoRI и NotI. Амплификацию проводили при следующих условиях: 20 с при 98 °С, 15 с при 53 °С, 60 с при 72 °С в присутствии Кара-полимеразы (КараBiosystems, США). Фрагмент ДНК с геном *man1* лигировали с вектором pPIC9α в рамку с сигнальным пептидом MFα. Среди Ar<sup>R</sup> колоний *E. coli* отобрали трансформант с плазмидой pPIC-man1-Aacu (9097 пн). Точность конструкции подтвердили секвенированием ДНК.

### Трансформация дрожжей *P. pastoris* и культивирование рекомбинантных штаммов

Плазмиду pPIC-man1-Aacu обработали ферментом BglII (Thermo Scientific, Литва) и 1–5 мкг ДНК трансформировали в клетки *P. pastoris* GS115 с использованием электропоратора GenePulserXcell™ (Bio-Rad, США) при следующих параметрах: 1500 В, 25 мкФ, 400 Ом, время 0,01 с. Трансформанты отбирали на среде YNB с глюкозой (1%). Наличие гена *man1* подтверждали методом ПЦР с использованием в качестве матрицы геномной ДНК, выделенной из трансформантов с помощью набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific).

Культивирование рекомбинантных штаммов-продуцентов проводили следующим образом. Свежей культурой со среды YNB с глюкозой (1%) засеивали 5 мл жидкой среды YP с глюкозой (1%). Пробирки инкубировали при 30 °С и 250 об/мин в течение 24 ч. Переносили посевную культуру в колбы с 50 мл жидкой среды YP с глюкозой (1%) и культивировали при 30 °С и 250 об/мин в течение шести дней. Метанол (3%) добавляли к культуре через 24 и 48 ч культивирования. Биомассу отделяли центрифугированием при 2500 g в течение 10 мин. Культуральную жидкость (КЖ) без биомассы использовали для тестирования манназы. Культивирование в пробирках проводили в 4 мл среды YPD при тех же условиях.

### Биохимические методы анализа

Активность β-манназы определяли по методу Миллера с динитросалициловой кислотой (ДНС), используя маннозу как стандарт [15]. В качестве субстрата использовали галактоманнан LBG – камедь рожкового дерева (Sigma, США). Стандартная реакционная смесь состояла из 0,1 мл раство-

ра 1%-ного субстрата (вес/объем) в 0,1 М ацетатном буфере, pH 4,0 и 0,1 мл образца фермента. В качестве образцов фермента использовали КЖ, полученную в результате культивирования рекомбинантных штаммов *P. pastoris*, как без разведения, так и разбавленную в 100, 250 и 500 раз в растворе буфера. Все измерения проводились трижды. Реакционную смесь инкубировали при 50 °С в течение 10 мин, затем добавляли 0,3 мл раствора ДНС и инкубировали при 98 °С в течение 5 мин. Оптическую плотность (ОП) при длине волны 540 нм определяли в плашке на 96 лунок на спектрофотометре Multiskan spectrum (Thermo scientific). За единицу ферментативной активности манназы (1 ед) принимали количество фермента, действующего на субстрат с высвобождением 1 мкМ восстанавливающих сахаров (маннозы) за 1 мин.

Концентрацию белка определяли с использованием Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay (Pierce, США) согласно инструкции. Для очистки и концентрирования белка из супернатанта применяли метод ультрафильтрации с использованием колонок с мембранами для белков на 50, 30 и 10 кДа (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices, Merck Millipore, США). Электрофорез белков проводили в 12%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra Bio-Rad (Bio-Rad). Для визуализации белков использовали Кумасси бриллиантовый синий R250.

### Методы определения свойств фермента

Активность β-манназы по отношению к субстрату (камедь рожкового дерева) была измерена в диапазоне значений pH 2,0–9,0 с использованием 0,1М растворов цитратного (pH 1,0–4,0), фосфатного (pH 5,0–7,0) и боратного (pH 8,0–9,0) буферов при температуре 50 °С в течение 10 мин. Стабильность фермента в диапазоне значений pH 2,0–8,0 была измерена после выдерживания фермента в соответствующем буфере в течение 24 ч при температуре 40 °С без субстрата. Относительную активность рассчитывали как процент от максимальной активности фермента, измеренной в реакциях в диапазоне значений pH 2,0–9,0 при температуре 50 °С. Остаточную активность рассчитывали как процент от исходной активности, измеренной перед инкубацией фермента в буферах с различными значениями pH в течение 24 ч при температуре 50 °С.

Определение оптимальных значений температуры проводили в реакции с субстратом в 0,1М цитратном буфере (pH 4,0) в диапазоне температур

от 25 до 85 °С с шагом 5 °С. Относительную активность рассчитывали как процент от максимальной активности фермента, измеренной в реакциях в диапазоне значений температур от 25 до 85 °С.

Перед определением термостабильности образцы выдерживали в 0,1 М цитратном буфере (рН 4,0), содержащем 50 мкг/мл BSA, при температуре 25–70 °С в течение 24 ч. Для оценки термостабильности фермента при 80 °С образец фермента делили на две пробирки, одну держали при комнатной температуре, а другую прогревали при 80 °С в течение 10 мин. Реакцию с субстратом проводили при температуре 50 °С в течение 10 мин. Остаточную активность рассчитывали как процент от исходной активности, измеренной перед инкубацией фермента при различной температуре в течение 24 ч или прогревом при 80 °С.

Определение кинетических параметров проводили в 0,1М цитратном буфере (рН 4,0) и температуре 65 °С. Использовали растворы субстрата с диапазоном концентраций 1–5 мг/мл. Образцы отбирали в промежутке от 2 до 10 мин. Измерения проводили в трех повторностях. Кинетические характеристики фермента ( $K_m$  и  $V_{max}$ ) определяли по графику зависимости обратных величин субстрата (ось абсцисс) и скорости реакции (ось ординат) согласно методу Лайнуивера-Берка.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

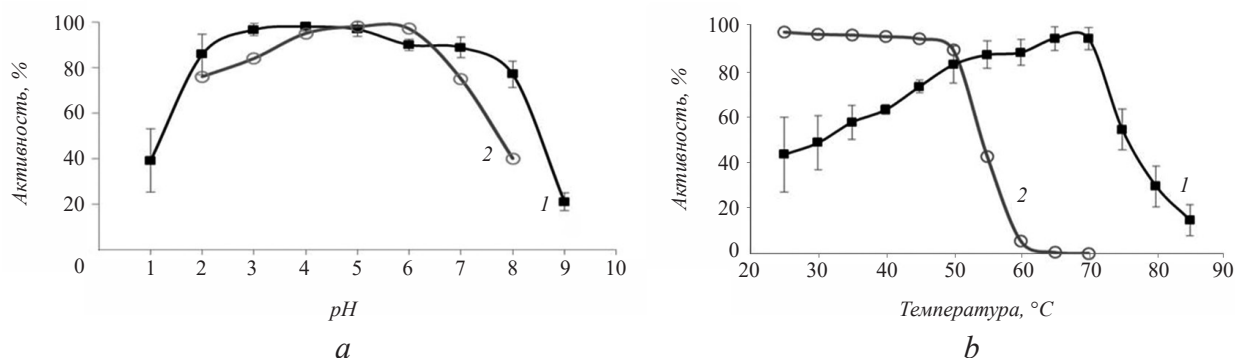
Перспектива использования гена *man1* *A. aculeatus* для создания суперпродуцентов на основе дрожжей *P. pastoris* оценивалась на основе анализа промышленно-ценных свойств фермента (с учетом возможного влияния особенностей гликозилирования) и проверки эффективности

синтеза и секреции этой маннаназы в дрожжевых клетках.

Синтезированный ген *man1*  $\beta$ -маннаназы из штамма *A. aculeatus* KSM510 был клонирован в вектор pPIC9 $\alpha$  в рамку с сигнальной последовательностью MF $\alpha$  и была отобрана плазмида pPIC-man1-Ааси. Последовательность нуклеотидов синтезированного гена *man1* из гриба *A. aculeatus* была идентична последовательности L35487, за исключением замены С→G в области NotI сайта, не приводящей к изменению последовательности аминокислот. Плазмидой pPIC-man1-Ааси, обработанной ферментом BglII, трансформировали штамм *P. pastoris* GS115. Двенадцать случайно отобранных трансформантов культивировали в пробирках и тестировали активность маннаназы в КЖ. Активность  $\beta$ -маннаназы *A. aculeatus* в КЖ трансформантов варьировала от 30 до 300 ед/мл. Наличие в геноме всех анализируемых трансформантов инсерции с геном *man1* *A. aculeatus* было подтверждено методом ПЦР.

Ранее ген *man1* из штамма *A. aculeatus* KSM510 (L35487) был экспрессирован в грибе *A. oryzae* и в дрожжах *S. cerevisiae*, и рекомбинантная маннаназа была охарактеризована [7, 9]. Ген *man1* из штамма *A. aculeatus* KSM510 идентичен гену *man1* из штамма *A. aculeatus* MRC11624 на 99,7%, белковые последовательности отличаются одной аминокислотой в положении 225 (Thr/Ser). Данная замена находится в варибельной области  $\beta$ -маннаназ из семейства GH5 и не влияет на структуру и функции белка [6].

Результаты изучения зависимости активности  $\beta$ -маннаназы от рН и температуры приведены на рис. 1.  $\beta$ -Маннаназа активна в широком диапазоне значений рН (2,0–8,0) и температур (45–70 °С).



**Рис. 1.** Зависимость активности  $\beta$ -маннаназы *A. aculeatus* от рН и температуры. *a* – зависимость от рН, проверялась при температуре 50 °С; *b* – зависимость от температуры проверялась в 0,1М цитратном буфере (рН 4,0). 1 – относительная активность; 2 – остаточная активность (стабильность фермента)

**Fig. 1.** The effect of pH and temperature on activity and stability of recombinant  $\beta$ -mannanase from *A. aculeatus*. Panel *a*: the pH effect. It was determined at 50 °С. Panel *b* – the temperature effect. It was tested in 0,1M of citrate buffer (pH 4,0). 1 – the relative activity; 2 – the residual activity

Максимальная активность наблюдалась при pH 4,0 и температуре 65–70 °С по результатам трех независимых экспериментов. Рекомбинантный фермент сохраняет свыше 70% активности после его выдерживания в буферных растворах с pH 2,0–7,0 в течение 24 ч и свыше 80% активности после выдерживания при температурах 25–50 °С в 0,1 М цитратном буфере (pH 4,0) в течение одних суток. Остаточная активность фермента быстро падает после его инкубации при температурах выше 50 °С в течение 24 ч. Остаточная активность  $\beta$ -маннаназы *A. aculeatus* после выдерживания белка при температуре 80 °С в течение 10 мин составляет 5,5%. Рекомбинантная  $\beta$ -маннаназа *A. aculeatus*, продуцируемая *P. pastoris* по таким параметрам, как активность в широком диапазоне значений pH и температур, быстрая потеря активности при температурах выше 70 °С, сравнима с  $\beta$ -маннаназой *A. aculeatus*, экспрессированными в других штаммах-хозяевах [6–10]. Значения pH и температуры, при которых  $\beta$ -маннаназы *A. aculeatus* имеет максимальную активность, варьируют при использовании различных экспрессионных систем: оптимальные значения pH и температуры для фермента, продуцируемого природным штаммом и дрожжами *S. cerevisiae*, составляют pH 3,0 и 50 °С, грибом *A. niger* – pH 3,8 и 75–80 °С, грибом *A. oryzae* – pH 5,0 и 60–70 °С [6–8].

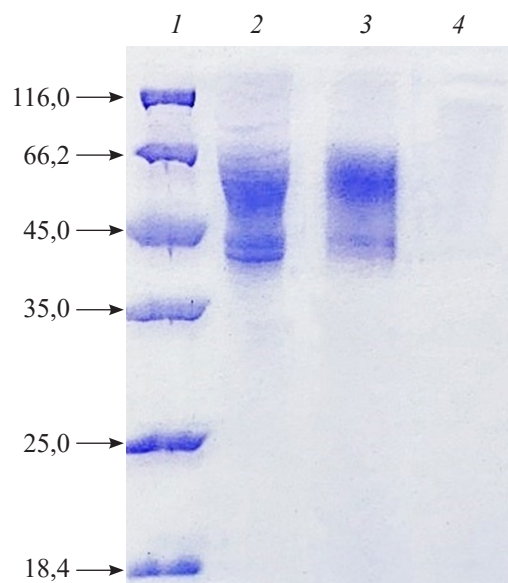
Штамм *P. pastoris* ВКПМ Y-4448 с наибольшей активностью  $\beta$ -маннаназы в КЖ был отобран для наработки и анализа фермента. После пяти дней культивирования штамма в колбе на среде с метанолом отделяли биомассу центрифугированием и определяли в КЖ ферментативную активность и количество белка. Штамм *P. pastoris* ВКПМ Y-4448 секретирует около 0,3 мг/мл белка при активности фермента в КЖ около 300 ед/мл. Для  $\beta$ -маннаназы *A. aculeatus* были определены кинетические параметры  $K_m$  и  $V_{max}$ , соответственно, 1,5 мг/мл и 370 мкМ/мин/мг.

Белок маннаназы после ультрафильтрации КЖ с использованием колонок Amicon Ultra-15 анализировали белковым электрофорезом в денатурирующих условиях в 12%-ном полиакриламидном геле. Анализ показал, что рекомбинантная  $\beta$ -маннаназы *A. aculeatus* секретируется в среду в виде гликозилированного белка, на что указывает наличие на геле диффузных полос массой 45–60 кДа. Основная полоса соответствует белку с молекулярной массой около 60 кДа (рис. 2).

Сравнение полученных нами результатов с ранее опубликованными характеристиками маннаназ гена *man1* *A. aculeatus* свидетельствует о за-

висимости молекулярной массы белка от используемых экспрессионных систем, что, вероятно, связано со степенью гликозилирования, так как у  $\beta$ -маннаназы *A. aculeatus* имеется четыре предполагаемых сайта гликозилирования. Расчетная масса зрелой  $\beta$ -маннаназы *A. aculeatus*, синтезируемой в *P. pastoris*, составляет 41 кДа. Гликозилированная  $\beta$ -маннаназы *A. aculeatus* KSM510, синтезированная грибом *A. oryzae*, имеет молекулярную массу 45 кДа [11].  $\beta$ -Маннаназы, синтезируемая штаммом *A. aculeatus* MRC11624, имеет молекулярную массу 45 кДа, при экспрессии в дрожжах *S. cerevisiae* – 45–50 кДа, при экспрессии в грибах *A. niger* – 50 кДа и при экспрессии в дрожжах *Y. lipolytica* – 70–80 кДа [6, 8, 10].

По уровню продуктивности рекомбинантный штамм *P. pastoris* ВКПМ Y-4448 не уступал или был сопоставим с ранее описанными рекомбинантными штаммами, полученными на основе иных экспрессионных систем. При ферментации в колбах штамма *S. cerevisiae* Y294, в котором



**Рис. 2.** Анализ рекомбинантной  $\beta$ -маннаназы *A. aculeatus* в денатурирующих условиях на 12%-ном полиакриламидном геле. 1 – стандартный маркер молекулярной массы; 2 – фракция 1 (15 мкл), полученная после ультрафильтрации на колонках Amicon Ultra-15; 3 – КЖ (15 мкл) с  $\beta$ -маннаназой *A. Aculeatus*; 4 – КЖ (15 мкл) штамма *P. pastoris* GS115 с плазмидой pPIC9 $\alpha$  (контроль)

**Fig. 2.** SDS-PAGE analysis of recombinant  $\beta$ -mannanase *A. aculeatus*. Lane 1: molecular mass standard protein; lane 2: the fraction 1 (15  $\mu$ L) after ultrafiltration on Amicon Ultra-15 column; lane 3: culture supernatant (15  $\mu$ L) containing the  $\beta$ -mannanase of *A. aculeatus*; lane 4: culture supernatant (15  $\mu$ L) of the control *P. pastoris* GS115 strain carrying the pPIC9 $\alpha$

транскрипция гена *man1* контролировалась промотором гена *ADH2*, активность  $\beta$ -маннаназы в КЖ составляла 31,2 ед/мл [6]. Рекombинантный штамм *Y. lipolytica* Polh, в котором экспрессия гена *man1* находилась под контролем промотора hr4d, продуцировал маннаназу с активностью 784 ед/мл [10]. Наибольшая продуктивность была показана для рекомбинантного продуцента, полученного на основе штамма *A. niger* D15, в котором транскрипция гена *man1* *A. aculeatus* находилась под контролем промотора *gpd*. При культивировании штамма на среде с кукурузным экстрактом и высокой концентрацией глюкозы в колбах активность  $\beta$ -маннаназы в КЖ составляла 995 ед/мл [8].

Следует отметить, что при конструировании метанол-индуцибельных суперпродуцентов ферментов на основе дрожжей *P. pastoris* уровень накопления фермента в КЖ может быть существенно повышен путем увеличения копийности клонируемого гена фермента, а оптимизация условий культивирования рекомбинантных штаммов *P. pastoris* в ферментерах обычно позволяет повысить уровень накопления фермента, по отношению к ферментации в колбах, примерно в 10 раз. Показано, в частности, что при культивировании штамма *P. pastoris* X-33 – продуцента  $\beta$ -маннаназы *A. sulphureus* в ферментере активность  $\beta$ -маннаназы в КЖ составила 1100 ед/мл, что в 9 раз выше по сравнению с экспериментами в колбах [16].

Полученные результаты позволяют считать использование гена *man1*  $\beta$ -маннаназы *A. aculeatus* перспективным для создания промышленных суперпродуцентов на основе дрожжей *P. pastoris*. Рекombинантная  $\beta$ -маннаназа *A. aculeatus* хорошо экспрессируется и секретируется дрожжами *P. pastoris*, активна и стабильна в широком диапазоне значений pH и температуры и может использоваться в ферментных кормовых добавках.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства (Государственное задание № 595-00004-18 ПР) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Nunes F.M., Reis A., Domingues M.R., Coimbra M.A. Characterization of galactomannan derivatives in roasted coffee beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54(9), 3428–3439.

2. Moreira L.R., Filho E.X. An overview of mannan structure and mannan – degrading enzyme systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 79, 165–178. doi: 10.1007/s00253-008-1423-4
3. Puls J., Schuseil J. Chemistry of hemicellulose: relationship between hemicellulose structure and enzyme required for hydrolysis. In: Coughlan, M.P., Hazlewood, G.P. (eds). *Hemicellulose and hemicellulases*, Portland, London, 1993, 1–27.
4. Henrissat B., Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 1993, 293, 781–788.
5. Cantarel B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., and Henrissat B. The carbohydrate-active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37, D233–D238.
6. Setati ME, Ademark P, van Zyl WH, Hahn-Hagerdal B, Stalbrand H. Expression of the *Aspergillus aculeatus* endo-beta-1,4-mannanase encoding gene (*man1*) in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expr. Purif.*, 2001, 21(1), 105–114.
7. Christgau S, Kauppinen S, Vind J, Kofod LV, Dalbøge H. Expression cloning, purification and characterization of a beta-1,4-mannanase from *Aspergillus aculeatus*. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1994, 33 (5), 917–925.
8. van Zyl P.J., Moodley V., Rose S.H., Roth R.L. and van Zyl W.H. Production of the *Aspergillus aculeatus* endo-1,4- $\beta$ -mannanase in *A. niger*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 36, 611–617. doi: 10.1007/s10295-009-0551-x
9. Malherbe A.R., Rose S.H., Viljoen-Bloom M., van Zyl W.H. Expression and evaluation of enzymes required for the hydrolysis of galactomannan. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 41, 1201–1209.
10. Roth R., Moodley V., van Zyl P. Heterologous Expression and Optimized Production of an *Aspergillus aculeatus* Endo-1,4- $\beta$ -mannanase in *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Biotechnol.*, 2009, 43, 112–120. doi: 10.1007/s12033-009-9187-3
11. Christgau S., Kofod L.V., Andersen L.N., Kauppinen S., Held-Hansen H.P., Dalboege H. Enzyme exhibiting mannanase activity. Patent US5795764 (A), 1998.
12. Gorgens J.F., van Zyl W.H., Rose S.H., Setati M.E., de Villiers T. Method of producing hemicellulose-containing enzyme compositions and use thereof. 2006. Patent ZA2006/03771, 11 May 2006.
13. Yanic M., Rotticci-Mulder M., Martinelle M., et al. Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2002, 24, 385–393.
14. Hasslacher M., Schall M., Hayn M., Bona R., Rumbold K., Luckl J., Griengl H., Kohlwein S.D., Schwab H. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expr. Purif.*, 1997, 11, 61–71. doi: 10.1006/prep1997.0765

15. Miller G.L., Blum R., Glennon W.E., Burton A.L. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry*, 1960, 2, 127–132. doi: 10.1016/0003-2697(60)90004-X
16. Chen X., Qiao J., Yu H., Cao Y. Overexpression of an optimized *Aspergillus sulphureus*  $\beta$ -mannanase gene in *Pichia pastoris*. *Biologia*, 2009, 64/2, 235–238. doi: 10.2478/s11756-009-0043-5

## Expression of *Aspergillus aculeatus* $\beta$ -mannanase in *Pichia pastoris* Yeast and Analysis of Industrially Important Properties of Enzyme

M.G. TARUTINA<sup>1,\*</sup>, M.N. LAZAREVA<sup>1</sup>, E.I. SEMENKO<sup>1</sup> and S.P. SINEOKY<sup>1</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

\*e-mail: m\_tarutina@mail.ru

Received November 08, 2018

Revised November 28, 2018

Accepted January 15, 2019

**Abstract**–  $\beta$ -Mannanases are enzymes for the industrial application and they can be used, in particular, in the feed industry. The most important requirements for feed enzymes are broad pH range, thermal stability and high specific activity. The efficient expression of the *man1* gene encoding *Aspergillus aculeatus*  $\beta$ -1,4-mannanases in *Pichia pastoris* yeast cells has been obtained for the first time. The industrially valuable properties of the enzyme were confirmed. The obtained data indicate that the *man1* gene from *A. aculeatus* is potentially useful for the construction of industrial mannanase producers on the basis of the *Pichia pastoris* yeast.

**Key words:** recombinant  $\beta$ -mannanase, *Pichia pastoris*, *Aspergillus aculeatus*, overexpression.

**Acknowledgements** – The work was financially supported by State project №595-00004-18 PR and used the help of the National Bioresource Center - Russian National Collection of Industrial Microorganisms NRC «Kurchatov Institute» - GosNIIgenetika (Moscow, Russia).

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-1-38-44