

УДК 579.66

Новая рекомбинантная фитаза из *Kosakonia sacchari*: характеристика и биотехнологический потенциал

© 2019 Т.Л. ГОРДЕЕВА^{1,*}, Л.Н. БОРЩЕВСКАЯ¹, А.Н. КАЛИНИНА¹, Н.В. БУЛУШОВА¹, С.П. СИНЕОКИЙ¹, С.П. ВОРОНИН², М.Д. КАШИРСКАЯ²

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

²ЗАО «Биоамид», Саратов, 410033

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

Поступила в редакцию 07.06.2019 г.

После доработки 25.06.2019 г.

Принята к публикации 09.07.2019 г.

В качестве объекта в базе данных GenBank была выбрана последовательность ДНК из *Kosakonia sacchari*, которая по результатам автоматического компьютерного анализа предположительно соответствует гену, кодирующему кислую гистидиновую фитазу. Последовательность гена была оптимизирована по кодоновому составу, синтезирована, клонирована и экспрессирована в *Pichia pastoris*. Для очищенного рекомбинантного фермента были определены основные характеристики. Оптимальное для работы фитазы значение pH – 4,5 и температуры – 50 °C. Значения удельной активности, константы Михаэлиса (K_m) и максимальной скорости реакции (V_{max}) в отношении фитага натрия составили 1470 ед/мг, 193 мкМ и 2167 мкМ·мин⁻¹·мг⁻¹, соответственно. Было показано, что фитаза характеризуется широким диапазоном рабочего интервала pH. Таким образом, новая рекомбинантная фитаза по своим характеристикам обладает достаточно высоким потенциалом для использования в агробиотехнологии.

Ключевые слова: фитаза *Kosakonia sacchari*, кислые гистидиновые фосфатазы, *Pichia pastoris*

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-33-41

Фитат (мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфат) является основной формой хранения фосфора в зерновых, бобовых, семенах масличных, орехах [1]. Животные с однокамерным желудком не способны усваивать фитатный фосфор [2]. Кроме того, фитаты являются антипитательными агентами, они образуют нерастворимые комплексы с белками и ионами металлов, такими как кальций, медь, цинк, и таким образом снижают биодоступность питательных веществ [3].

Фитазы (мио-инозитол-гексакисфосфат-фосфогидролазы) гидролизуют фитат до неорганического фосфата и фосфорилированных производных мио-инозитола и с успехом используются

в качестве кормовой добавки, значительно повышая усвоение фосфора [4]. Они широко распространены в природе, встречаются в растениях, микроорганизмах и животных [5].

В настоящее время фитазы получают микробиологическим путем с использованием рекомбинантных штаммов-продуцентов, созданных, в частности на основе метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. Данные дрожжи могут расти в простых средах, достигая при этом очень высокой плотности культуры. Они успешно используются для гетерологичной экспрессии генов под индуцибельным промотором АOX1 и способны продуцировать высокие уровни рекомбинантных белков, в том числе фитаз [6].

Список сокращений: а.о.– аминокислотные остатки; пн – пары нуклеотидов; ПЦР – полимеразная цепная реакция; CAI – индекс адаптации кодонов.

В зависимости от структуры фермента и механизма катализа фитазы можно разделить на четыре класса: кислые гистидиновые фосфатазы, β -пропеллерные фитазы, цистеиновые и пурпурные кислые фосфатазы [7]. Однако в гастроэнтеральном тракте животных наиболее эффективно работают кислые гистидиновые фитазы. Ферменты этого класса были найдены как в бактериях, так и в грибах. Однако фитазы, выделенные из бактерий семейства Enterobacteriaceae, например, из таких его представителей, как *Escherichia*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Buttiauxella*, обладают наиболее ценными для промышленного использования свойствами [8]. Кормовые препараты, содержащие фитазы бактерий семейства Enterobacteriaceae, стали коммерчески доступными сравнительно недавно (с 2013 г.) и выводятся на рынок по настоящее время. Данные ферменты характеризуются высокими значениями удельной активности, каталитической эффективности и субстратной специфичности, а также устойчивостью к действию протеолитических ферментов [8, 9]. Однако, условия для оптимальной работы фитаз различаются, например рабочим интервалом температуры и pH. Наличие фитаз с разнообразными свойствами обеспечивает широкий выбор ферментов для конкретных задач кормопроизводства. Таким образом, актуальным остается поиск новых бактериальных фитаз с промышленно-ценными характеристиками.

Кислые гистидиновые AppA-фитазы, выделенные из бактерий, принадлежащих к семейству Enterobacteriaceae, как правило, обладают промышленно-ценными свойствами и имеют высокий биотехнологический потенциал. Геном бактерий *Kosakonia sacchari*, принадлежащих к семейству Enterobacteriaceae, содержит ДНК последовательность (NZ_FOAY01000005.1. (241623..242912)), кодирующую, предположительно, кислую гистидиновую фитазу, предсказанную в результате автоматического компьютерного анализа (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_FOAY01000005.1?report=genbank).

Цель настоящей работы – экспрессировать в дрожжах *P. pastoris* ген, кодирующий фитазу из *K. sacchari*, выделить и охарактеризовать полученный рекомбинантный белок.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Реактивы

Триптон, пептон, дрожжевой экстракт, глюкоза, глицерин были получены от компании «Диа-М» (Россия), все ферменты для молекулярных работ –

от фирмы Fermentas (Литва), фитат натрия от Sigma, (Швейцария), соли и другие реагенты – от фирмы «Химмед» (Россия). Все реактивы отечественного производства марки хч или чда.

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^r)]). Культуру растили при 37 °C в среде LB (состав, г/л: триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 5; если необходимо, добавляли ампициллин (Sigma, США) в концентрации 100 мкг/мл).

Штамм *Pichia pastoris* ВКПМ Y-4334 (*HIS4*-) был получен из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Культуру дрожжей *Pichia pastoris* растили при 30 °C на среде YPD (состав, г/л: пептон – 20; дрожжевой экстракт – 15; глюкоза – 20). Все плотные среды содержали агар в концентрации 20 г/л.

Для отбора трансформантов *P. pastoris* использовали минимальную среду M9 (состав, г/л: Na₂HPO₄ – 6; KH₂PO₄ – 3; NaCl – 0,5; NH₄Cl – 1; MgSO₄ 7H₂O – 0,65; CaCl₂ – 0,111; агар – 20; витамины, микроэлементы, глюкоза – 20). Состав витаминов и микроэлементов приведен в [10].

Анализ нуклеотидной и аминокислотной последовательностей

Гомологичное выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Наличие лидерного пептида определяли с использованием сервера SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>). Для построения и анализа трехмерной модели фермента использовали сервер SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) и данные NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=FEPKXPDG015&mode=all>). Поиск сайтов для N-гликозилирования осуществляли посредством данных сервера NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Оптимизация последовательности гена фитазы

В качестве исходной нуклеотидной последовательности гена *phyS*, кодирующего фитазу из *K. sacchari*, использовали ДНК последовательность, приведенную в международной базе данных GenBank под номером NZ_FOAY01000005.1. (241623 ... 242912).

Оптимизированная последовательность гена *phyS3-mod* была разработана согласно частотам встречаемости кодонов в дрожжах *P. pastoris* [11]. Для дизайна полученной последовательности, анализа процентного содержания GC-пар и удаление AT-богатых областей использовали программы <https://eu.idtdna.com/CodonOpt>, <https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis>. Полученная последовательность представлена в международной базе данных GenBank под номером MN066164.

Конструирование экспрессионной интеграционной плазмиды и рекомбинантного штамма *P. pastoris*

Для конструирования плазмиды использовали экспрессионный вектор pPIC9 α [12], содержащий в своем составе индуцибельный промотор *AOX1*, сигнал секреции α -фактор дрожжей *S. cerevisiae*, селективный маркер *HIS4*. Ген с оптимизированным нуклеотидным составом *phyS3-mod* синтезировали методом [13] в НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, (Россия). На 5'- и 3'-концах нуклеотидной последовательности были предусмотрены сайты рестрикции *EcoRI* и *NotI* для клонирования в вектор pPIC9 α . 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 #КО692 (Fermentas, Литва). Все стандартные генно-инженерные манипуляции (обработка ДНК ферментами, лигирование, трансформация клеток *E. coli*) проводились в соответствии со сборником методик [14].

Полученную рекомбинантную плазмиду расщепляли эндонуклеазой рестрикции *BglIII* и трансформировали в клетки *P. pastoris* согласно протоколу Kit #28662 (Invitrogen). Трансформанты отбирали по способности расти на минимальной среде M9 без источника гистидина. Наличие интеграционной кассеты в составе хромосомы трансформантов определяли методом ПЦР с использованием праймеров: *PhyS3-mod-F* (5'-tctgtaagtctgaaatgac-3'), *PhyS3-mod-R* (5'-ttacaaccacaagctgga-3').

Ферментация рекомбинантных штаммов *P. pastoris*

Для получения инокулята штаммы выращивали в течение 24 ч в жидкой питательной среде YP (5 мл) с добавлением 20 г/л глюкозы. За-

тем полученным инокулятом засеивали колбы со средой YP (50 мл), содержащей 10 г/л глицерина, в соотношении 1:10, и выращивали при 28 °C в течение 24 ч. Далее добавляли метанол в количестве 1% каждые сутки в течение 3 дней. Отбирали аликвоту, клетки осаждали центрифугированием, супернатант анализировали на наличие фитазной активности.

Выделение и очистка фитазы

Культуральную жидкость центрифугировали при g 14 000 в течение 5 мин. Для осаждения примесных белков к супернатанту добавляли равный объем 0,5M глицин-HCl буфера (pH 2,5) и выдерживали при 37 °C в течение 30 мин. Образец центрифугировали при 14000 g в течение 10 мин, супернатант очищали от остатков соли и низкомолекулярных компонентов на установке Amicon (Merck, Германия) через мембрану с порогом отсека 30 кДа и разбавляли в 5 раз 10 mM натрий ацетатным буфером (pH 4,5). Полученный раствор наносили на катионообменную колонку HiTrap SP 5мл (GE Healthcare, Швеция), предварительно уравновешенную 10 mM натрий ацетатным буфером (pH 4,5). Элюцию осуществляли линейным градиентом хлорида натрия (от 0 до 1M за 30 объемов колонки) в том же буфере. Фракцию, вышедшую отдельным пиком и проявившую фитазную активность, собирали и анализировали методом SDS-ПААГ электрофореза с использованием 12%-ного полиакриламидного геля (камера для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN® Tetra фирмы Bio-Rad) с последующим окрашиванием реактивом Coomassie brilliant blue R-250.

Концентрацию очищенного белка определяли методом Бредфорд посредством набора фирмы «Диа-М», согласно инструкции, и бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта («Диа-М»). Дегликозилирование фитазы проводили с использованием фермента EndoH A 0810 (Sigma) согласно прилагаемому протоколу.

Теоретический расчет молекулярной массы белка осуществляли посредством программы SnapGene (<http://www.snapgene.com/>). Реальную молекулярную массу белка определяли методом SDS-ПААГ-электрофореза.

Определение фитазной активности

Фитазную активность определяли по накоплению в реакционной смеси свободного фосфат-иона, детектируемого модифицированным методом Фиске-Суббарроу [15]. 100 мкл раствора

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

Определение свойств и кинетических характеристик фитазы

Для определения pH-профилей активности и стабильности фермента использовали следующие 0,2 М буферные растворы: глицин-HCl (pH 2,0–3,5), Na-ацетатный (pH 4,0–5,5) и трис-HCl (pH 6,0–8,0). Устойчивость фитазы к действию pH определяли путем выдерживания фермента в буферных растворах в интервале pH от 2,0 до 7,0 в течение 2 ч и при температуре 37 °С.

Для определения температурного оптимума ферментативная активность измерялась в интервале температур от 30 °С до 70 °С. Термостабильность определялась как остаточная активность после инкубации фермента при 50, 60, 70, 80 °С в течение 10 мин. Устойчивость к протеолитическим ферментам была изучена путем инкубирования фитазы в течение 2 ч в 0,1%-ном растворе пепсина (Sigma) при pH 2 и 0,1%-ном растворе трипсина (Sigma) (pH 7) при 37 °С с последующим измерением остаточной активности.

Влияние ионов металлов (K^+ , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Li^{2+}) и других реагентов (SDS, ЭДТА) на ферментативную активность исследовали путем добавления указанных веществ в реакционную смесь до конечной концентрации 1 мМ. Кинетические параметры определялись по зависимости скорости реакции от концентрации субстрата с последующей линеаризацией в координатах Лайнуивера-Берка. Реакцию проводили в 0,2 М ацетатном буфере, pH 4,5 при 37 °С в интервалах времени от 2 до 15 мин, используя растворы фитата натрия с различной концентрацией от 0,10 до 1,25 мМ в качестве субстрата. Все эксперименты проводились независимо в трех повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ аминокислотной последовательности фитазы *PhyS3* из *K. sacchari*

Анализ аминокислотной последовательности *PhyS3* (GenBank: WP_083416285.1) на основании множественного выравнивания, проведенный с использованием информационных ресурсов базы данных NCBI, позволили выявить N-концевой (RHGVRAAP) и C-концевой (HD) консервативные мотивы, характерные для активного центра фитаз семейства кислых гистидиновых фосфатаз (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=FEPKXPDG015&mode=all>). Пространственная структура трехмерной модели фитазы *PhyS3* была предсказана с помощью сервера SWISS-MODEL на основании наиболее гомологичной (75,12%) структуры фитазы из *Citrobacter braakii* (<https://swissmodel.expasy.org/templates/3zhc.1>). Ближайшим ферментом, с точки зрения аминокислотной гомологии (74,71%), является фитаза *C. freundii* (GenBank: WP_135911757.1). Аминокислотная гомология с фитазой *E. coli* (GenBank: WP_077392460.1) составляет 63,06%.

Согласно результатам, полученным с использованием сервера SignalP, в фитазе *PhyS3* предполагалось наличие сигнального пептида, состоящего из 19 аминокислотных остатков. Таким образом, размер зрелой части белка составил 407 а.о.

Оптимизация и клонирование гена *phyS* в экспрессионный вектор pPIC9 α

Оптимизация кодонов широко и успешно используется для улучшения уровня экспрессии гетерологичных белков в различных штаммах-хозяевах, в частности благодаря предотвращению потенциального истощения тРНК [16, 17]. Последовательность нативного гена *phyS* (1224 пн), кодирующая зрелую часть фитазы из *K. sacchari*, была оптимизирована с учетом частот встречаемости кодонов у эффективно экспрессирующихся генов в дрожжах *P. pastoris* [11].

Индекс адаптации кодонов CAI, являющийся мерой адаптации последовательности гена к предпочтительным кодоном, часто используется для предсказания уровней экспрессии генов, в том числе гетерологичных [18]. Значение индекса CAI для оптимизированной ДНК последовательности увеличилось с 0,59 до 0,92. Известно, что для генов с низким уровнем экспрессии характерны низкие значения индекса CAI. Высокий

уровень экспрессии характерен для генов со значением индекса CAI $\geq 0,8$ (<https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis>).

Для улучшения эффективности транскрипции гена фитазы содержание GC-пар было снижено с 50,83 до 44,75 % [19]. Для предотвращения преждевременной терминации транскрипции AT-богатые участки были удалены путем использования вырожденных кодонов, включающих минимальное количество аденина и тиамина.

Гомология оптимизированной ДНК последовательности *phyS3-mod* с последовательностью нативного гена *phyS* составила 72,96%, что соответствовало результатам гомологичного выравнивания последовательностей в программе BLAST.

Ген *phyS3-mod* был синтезирован и клонирован в интегративный экспрессионный вектор pPIC9 α [12] под контролем индуцибельного промотора гена *AOXI*. Для секреции фермента в культуральную жидкость в векторе предусмотрен сигнальный пептид, представляющий пре-последовательность α -фактора дрожжей *S. cerevisiae*. Была получена плазмида pPIC9 α -PhyS3-mod. Рестрикционный анализ и секвенирование показали, что экспрессионная плазмида сконструирована корректно (данные не приведены).

Экспрессия фитазы в дрожжах *P. pastoris*

Различные варианты рекомбинации гетерологичного гена оказывают влияние на эффективность экспрессии в дрожжах *P. pastoris* [20]. Таким образом, в положительных трансформантах уровень экспрессии гена, кодирующего фитазу, определяли в процессе скрининга с использованием чашечного теста [12]. Трансформанты выращивали на плотной селективной среде, содержащей фитат кальция, и для дальнейшей работы отбирали наиболее продуктивные трансформанты. Полученные трансформанты культивировали в полной питательной среде YP в одну стадию с двумя этапами: наработка биомассы и индукция синтеза рекомбинантного белка. Для фазы наработки биомассы в качестве единственного источника углерода использовали глицерин, так как он способен эффективно усваиваться клетками *P. pastoris*, и в небольших количествах он не ингибирует работу промотора *AOXI*. Синтез рекомбинантного белка индуцировали метанолом.

Количественно продуктивность трансформантов оценивали модифицированным методом Фиске-Субарроу [15]. Штамм, показавший наибольшую продуктивность после 72 ч индукции метанолом, составившую 327 ед/мл, был отобран для дальнейшей работы.

Очистка рекомбинантного белка

Рекомбинантная фитаза PhyS3 была очищена в два этапа. На первом примесные белки осаждали путем подкисления культуральной жидкости до pH 2,5, что не оказывало влияния на фермент из-за его кислотоустойчивости. На втором этапе белок был очищен до электрофоретической однородности методом катионообменной хроматографии.

SDS-ПААГ-электрофорез в 12%-ном полиакриламидном геле показал, что очищенный белок представлен на геле широкой полосой с молекулярной массой 50–55 кДа (рис. 1), что выше теоретически рассчитанного значения 44,6 кДа.

В дрожжах *P. pastoris* белки подвергаются посттрансляционным модификациям, в частности N- и O-гликозилированию [21]. Увеличение молекулярной массы фермента может являться следствием такого процесса. По данным сервера NetNGlyc 1.0 в аминокислотной последовательности фитазы PhyS3 насчитывается пять потенциальных сайтов для N-гликозилирования, однако предсказывается, что с наибольшей вероятностью должны быть гликозилированы только три из них: N169, N201 и N314.

Обработка фермента эндогликозидазой H показала снижение молекулярной массы фитазы

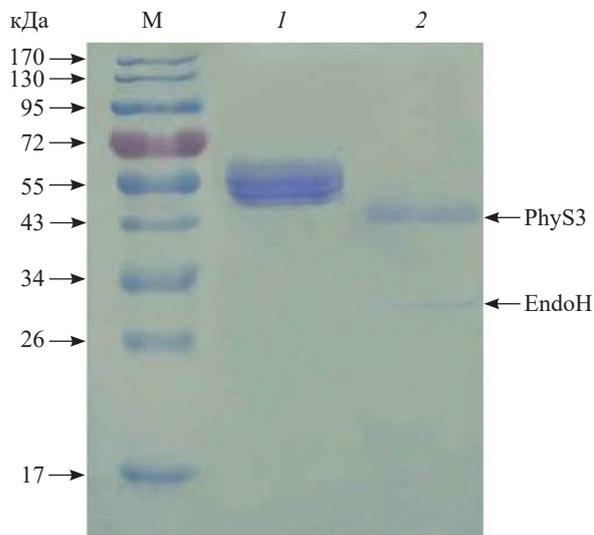


Рис. 1. SDS-ПААГ электрофорез очищенной фитазы PhyS3. М – маркер молекулярной массы (Thermo Scientific), 1 – очищенный фермент, 2 – очищенный фермент, обработанный EndoH. Справа обозначены полосы, соответствующие обработанному белку PhyS3 и ферменту EndoH

Fig. 1. SDS-PAGE of purified phytase PhyS3. M, molecular weight marker (Thermo Scientific), lane (1), purified enzyme, lane (2), purified enzyme, N-deglycosylated by EndoH

PhyS3 до значения близкого к теоретически рассчитанному (рис. 1).

Таким образом, рекомбинантная фитаза PhyS3 является N-гликозилированным белком.

Свойства рекомбинантной фитазы

Удельная активность очищенного фермента PhyS3 составила 1470 ед/мг белка. Это значительно выше, чем у применяющейся в промышленности фитазы из *Aspergillus niger* (100 ед/мг) [22], и сопоставимо со значениями удельных активностей таких известных коммерческих ферментов, как фитазы из *E. coli* (1800 ед/мг) [23], *Peniophora lycii* (864 ед/мг) [24], *Buttiauxella* sp. (1180 ед/мг) [25].

Для рекомбинантной фитазы были вычислены кинетические параметры гидролиза фитата натрия согласно методу Лайнуивера-Берка. Значение константы Михаэлиса (K_m) составило $193 \pm 4,8$ мкМ, что показывает высокое сродство данного фермента к субстрату. Полученное значение меньше, чем у коммерчески доступных фитаз: из *E. coli* (550 мкМ) [26], *Buttiauxella* sp. (360 мкМ) [25], *Citrobacter braakii* (460 мкМ) [27], но больше, чем у фитазы из *Y. intermedia* (125 мкМ) [28].

Максимальная скорость реакции (V_{max}) для PhyS3 составила 2167 мкМ·мин⁻¹·мг⁻¹, что сопоставимо с V_{max} для рекомбинантной фитазы из *Citrobacter freundii* (2380 мкМ·мин⁻¹·мг⁻¹) [21], превышает значение V_{max} для *Buttiauxella* sp. (1390 мкМ·мин⁻¹·мг⁻¹) [25], но ниже, чем для фитазы из *Citrobacter braakii* (6027 мкМ·мин⁻¹·мг⁻¹) [27].

Была изучена активность рекомбинантной фитазы при различных значениях pH и температуры (рис. 2).

Как видно из рис. 2, оптимальное значение pH для работы фермента наблюдалось при значении 4,5. Следует отметить, что фитаза PhyS3 обладает достаточно широким диапазоном рабо-

чего интервала pH. Так, при pH 3,0 сохраняется более 50% фитазной активности, а при pH 5,5 – более 60%. Для сравнения, у коммерческой фитазы *Citrobacter braakii* сохраняется около 60% фитазной активности при pH 3,0, однако при pH 5,5 – менее 50% [27].

Как показали исследования, у бройлеров фитазы должны быть наиболее активны в зобу (pH 4,0–5,0) и железистом желудке (pH 2,5–3,5) [29]. Значение pH пищеварительного тракта свиней варьируется от 2,0 до 5,5, однако, наибольшее количество времени (от 2 до 5 ч) пища переваривается при pH 4,0 [30].

Таким образом, способность фитазы PhyS3 активно работать в широком интервале значений pH с оптимумом при 4,5 позволит ей эффективно гидролизовать фитат в гастроэнтеральном тракте животных.

Наибольшую активность фитаза проявляет в интервале температур от 40 до 55 °С, с оптимумом при 50 °С, сохраняя около 80% фитазной активности при 40 °С (рис. 2b). Известно, что физиологическая температура свиней составляет около 39 °С [31], а бройлеров 42 °С [32]. Таким образом, предполагается, что фермент PhyS3 будет эффективно работать в организме животных.

Было изучено влияние pH и температуры на стабильность рекомбинантной фитазы, а также устойчивость к протеолитическим ферментам (рис. 3).

Эффект pH на активность PhyS3 был изучен инкубированием фермента в буферных растворах с различными значениями pH при 37 °С в течение 2 ч. Фермент показал высокую устойчивость в широком диапазоне pH (рис. 3a). Значение остаточной фитазной активности менялось незначительно.

Фермент PhyS3 прогревали при различных температурах в интервале от 50 до 80 °С в течение

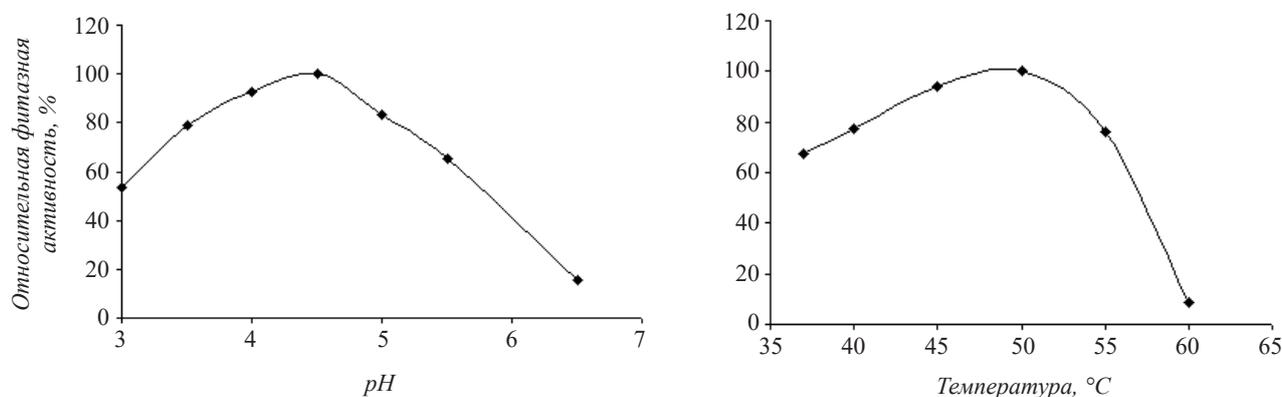


Рис. 2. Активность фитазы PhyS3 при различных значениях pH (a) и температуры (b)

Fig. 2. Activity of phytase PhyS3 at various pH (a) and temperatures (b)

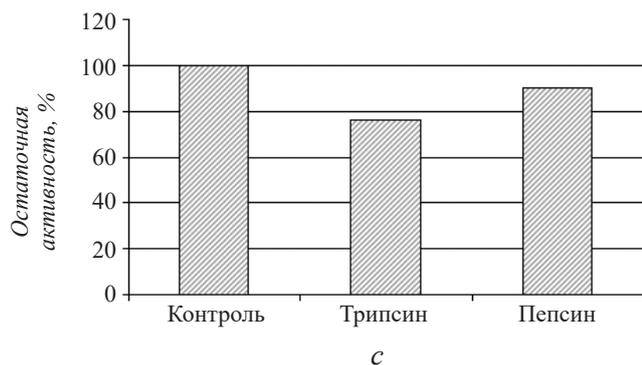
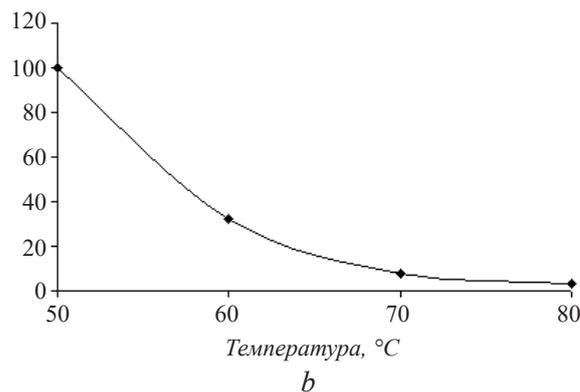
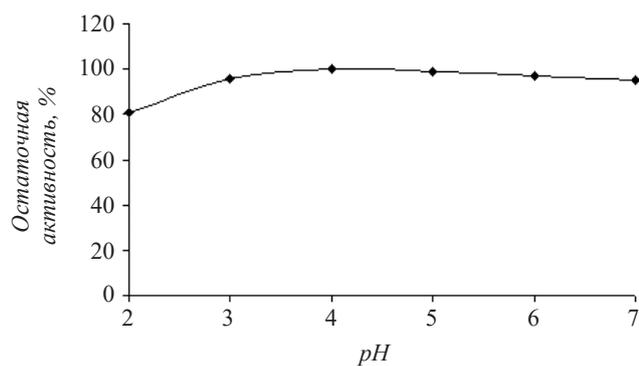


Рис. 3. Остаточная фитазная активность после инкубирования фермента при различных значениях pH в течение 2 ч при 37 °С (a), прогрева в течение 10 мин (b) и воздействия трипсина и пепсина в течение 1 ч при 37 °С (c)

Fig. 3. Residual phytase activity after incubating the enzyme at different pH values for 2 h at 37 °C (a), after heating at various temperatures for 10 min (b) and resistance of enzyme to pepsin and trypsin for 1 h at 37 °C (c)

10 мин. Как видно из графика на рис. 3b, фитаза не обладает высокой термостабильностью. Она сохраняет около 30% фитазной активности после прогрева при 60 °С, и практически полностью инактивируется при 70 °С.

Известно, что большинство бактериальных фитаз не являются термостабильными и теряют значительную часть своей активности после прогрева при высоких температурах [21]. Требование к фитазам по термоустойчивости обуславливается необходимостью кратковременного прогрева (5–10 мин) при повышенных температурах в процессе приготовления кормов. Однако для термочувствительных ферментов сейчас существуют альтернативные, более щадящие технологии, позволяющие избегать применения высоких температур при кормопроизводстве [33].

Устойчивость к действию протеолитических ферментов была изучена путем выдерживания PhyS3 в течение 2 ч при 37 °С в буферных растворах, содержащих пепсин и трипсин при оптимальных значениях pH для работы этих ферментов. Фитаза PhyS3 показала достаточную устойчивость к действию пищеварительных ферментов. Остаточная активность после воздействия трипсина составила 76%, а пепсина – 90% (рис. 3c). Так, фитазы из *A. niger*, *E. coli* и *Y. intermedia* сохраняют 80, 33, 82% и 78, 100, 87% фитазной активности после воздействия трипсина и пепсина в течение 2 ч, соответственно [28].

Было изучено влияние ионов металлов на активность фермента PhyS3 (рис. 4).

Как видно из диаграммы (рис. 4), Li⁺, Ni⁺, Ca²⁺ и ЭДТА оказывают незначительное стимулирующее действие на активность фермента PhyS3. Максимальное увеличение наблюдается при действии ионов Li⁺ (20%). Напротив, ионы Fe²⁺ и Cu²⁺, а также SDS снижают активность фитазы на 68, 26 и 44%. Аналогичное влияние наблюдалось и на другие фитазы, например из *E. coli* [26], *C. freundii* [21]. Ингибирующий эффект может быть вызван конформационными изменениями белка или образованием слаборастворимых комплексов ионов металлов с фитиновой кислотой [21].

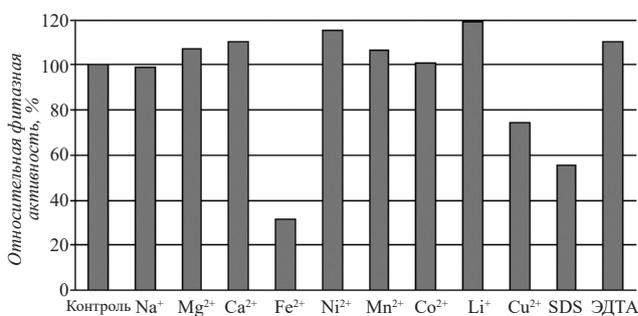


Рис. 4. Влияние ионов металлов на активность рекомбинантной фитазы PhyS3

Fig. 4. Effect of metal ions on activity of recombinant phytase PhyS3

В ходе данной работы впервые был оптимизирован, клонирован и экспрессирован в дрожжах *Pichia pastoris* ген, кодирующий фитазу из *Kosakonia sacchari*, а также выделен и охарактеризован очищенный рекомбинантный белок. Было показано, что фитаза PhyS3 обладает высокой удельной активностью, необходимыми кинетическими характеристиками, широким диапазоном рабочего интервала pH. Фермент показывает высокую активность при физиологических значениях pH и температуры животных. Таким образом, рекомбинантная фитаза PhyS3 обладает высоким потенциалом для использования в кормопроизводстве.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Yao M.Z., Zhang Y.H., Lu W.L., et al. Phytases: Crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.*, 2012, 112, 1–14. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05181.x
2. Woyengo T.A., Nyachoti C.M. Anti-nutritional effects of phytic acid in diets for pigs and poultry: current knowledge and directions for future research. *Can J Anim Sci.*, 2013, 93, 9–21. doi: 10.4141/cjas2012-017
3. Rimbach G., Pallauf J., Moehring J. Effect of dietary phytate and microbial phytase on mineral and trace element bioavailability. *Current Topics Nutraceutical Res.*, 2008, 6(3), 131–144.
4. 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
5. Humer, E., Schwarz C., Schedle K. Phytate in pig and poultry nutrition. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 2014, 99(4), 605–625. doi:10.1111/jpn.12258
6. Safder I., Khan S., Islam I., Kazim M. *Pichia pastoris* expression system: A potential candidate to express protein in industrial and biopharmaceutical domains. *Bio-medical Letters*, 2018, 4, 1–13.
7. Maldonado R.F., Maller A., Bonneil E., et al. Biochemical properties of glycosylation and characterization of a histidine acid phosphatase (phytase) expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, 2014, 99, 43–49.
8. Gessler N.N., Serdyuk E.G., Isakova E.P., Deryabina Y.I. Phytases and the prospects for their application (review). *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2018, 54(4), 352–360. doi: 10.1134/S0003683818040087
9. Roy M.P., Mazumdar D., Dutta S., et al. Cloning and expression of phytase *appA* gene from *Shigella* sp. CD2 in *Pichia pastoris* and comparison of properties with recombinant enzyme expressed in *E. coli*. *PLoS One*, 2016, 11:e0145745. doi: 10.1371/journal.pone.0145745
10. Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификации дрожжей. М.: Пищевая промышленность, 1979, 48.
11. Zhao X., Huo K., Li Y. Synonymous codon usage in *Pichia pastoris*. *Chin. J. Biotechnol.*, 2000, 16, 308–311.
12. Гордеева Т.Л., Борщевская Л.Н., Калинина А.Н., и др. Сравнительный анализ эффективности экспрессии генов бактериальных фитаз в дрожжах *Pichia pastoris* в чашечном тесте. *Биотехнология*, 2017, 33(6), 83–88. doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-83-88.
13. Gordeeva T.L., Borshevskaya L.N., Sineoky S.P. Improved PCR-based gene synthesis method and its application to the *Citrobacter freundii* phytase gene codon modification. *J. Microbiological Methods*, 2010, 81(2), 147–152.
14. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *CSHL*, 1989, 4–1626.
15. 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.
16. Luo H., Yao B., Yuan T., et al. Overexpression of *Escherichia coli* phytase with high specific activity. *Chin J. Biotechnol.*, 2004, 20, 78–84.
17. Гордеева Т.Л., Борщевская Л.Н., Калинина А.Н., и др. Экспрессия и характеристика фитазы из *Obesumbacterium proteus* в дрожжах *Pichia pastoris*. *Биотехнология*, 2018, 34(4), 18–25.
18. Sharp P.M., Li W.H. The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.*, 1987, 15(3), 1281–1295.
19. Teng D., Fan Y., Yang Y., 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, 1074–1083. doi: 10.1007/s00253-006-0765-z
20. Clare J.J., Rayment F.B., Ballantine, S.P., et al. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology*, 1991, 9, 455–460.
21. Zhao W., Xiong A., Fu X., et al. High level expression of an acid-stable phytase from *Citrobacter freundii* in *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2010, 162, 2157–2165. doi: 10.1007/s12010-010-8990-4
22. Ullah A. H. J., Gibson, D. M. Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: Purification and characterization. *Preparative Biochem. Biotechnol.*, 1987, 17, 63–91.

23. Golovan S., Wang G., Zhang J., Forsberg C.W. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Can. J. Microbiol.*, 2000, 46(1), 59–71.
24. Xiong A.S., Yao Q.H., Peng R.H., et al. High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 72(5), 1039–1047. doi: 10.1007/s00253-006-0384-8
25. Shi P., Huang H., Wang Y., et al. A novel phytase gene *appA* from *Buttiauxella* sp. GC21 isolated from grass carp intestine. *Aquaculture*, 2008, 275, 70–75.
26. Tai H. M., Yin L. J., Chen W. C., Jiang S. T. Overexpression of *Escherichia coli* phytase in *Pichia pastoris* and its biochemical properties. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61(25), 6007–6015. doi: 10.1021/jf401853b
27. Kim H.W., Kim Y.O., Lee J.H., et al. Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. *Biotechnol. Lett.*, 2003, 25, 1231–1234.
28. Huang H, Luo H, Yang P, et al. A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, 350, 884–889. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.09.118
29. 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. Ed. Proceedings of 1st European Symposium Enzymes in Animal Nutrition, Karthause Ittingen, Switzerland, 1993, 202–205.
30. Dersjant-Li Y., Awati A., Schulze H., Partridge G. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *J. Sci. Food Agric.*, 2015, 95(5), 878–896. doi: 10.1002/jsfa.6998
31. Neira-Vielmaa A.A., Aguilera C.N., Ilyinab A., et al. Purification and biochemical characterization of an *Aspergillus niger* phytase, produced by solid-state fermentation using triticale residues as substrate. *Biotechnology Reports*, 2018, 17, 49–54.
32. Welker J.S., Rosa A.P., Moura D.J., et al. Temperatura corporal de frangos de corte em diferentes sistemas de climatização. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2008, 37(8), 1463–1467.
33. Humer E., Schwarz C., Schedle K. Phytate in pig and poultry nutrition *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2015, 99, 605–625.

New Recombinant Phytase from *Kosakonia sacchari*: characteristic and biotechnological potential

T.L.GORDEEVA^{1,*}, L.N. BORSHCHEVSKAYA¹, A.N. KALININA¹, N.V. BULUSHOVA¹, S.P. SYNEOKY¹, S.P. VORONIN², and M.D. KASHIRSKAYA²

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

²Closed Joint Stock Co. BIOAMID, 410033, Saratov Russia

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

Received June 07, 2019

Revised June 25, 2019

Accepted July 09, 2019

Abstract—A DNA sequence from *Kosakonia sacchari* that according to automated computer analysis is believed to correspond to a gene for histidine acid phytase has been selected from the GenBank database. The sequence was optimized for codon composition, synthesized, cloned and expressed in *Pichia pastoris*. Main characteristics of the purified recombinant enzyme were determined. It was established that the values of pH=4.5 and temperature of 50 °C are optimal for the phytase functioning. The values of specific activity, Michaelis constant (K_m) and maximum reaction rate (V_{max}) with phytate as a substrate were 1470 U/mg, 193 μ M and 2167 μ mol/(min·mg), respectively. It was shown that the enzyme was characterized by a wide range of working pH. Therefore, the properties of a new recombinant phytase allow us to consider it as a high-potential enzyme for agrobiotechnology.

Key words: histidine acid phosphatases, *Kosakonia sacchari* phytase, *Pichia pastoris*

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

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-33-41