

УДК 606

Коэкспрессия генов, кодирующих β -глюканазы различного происхождения, как подход к созданию рекомбинантных дрожжевых штаммов-продуцентов ферментов с оптимальными свойствами

© 2019 Л.Н. БОРЩЕВСКАЯ^{1,*}, Т.Л. ГОРДЕЕВА¹, А.Н. КАЛИНИНА¹, А.С. ФЕДОРОВ¹, С.П. СИНЕОКИЙ¹

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

*e-mail: larisa.larbor3@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.09.2019 г.

После доработки 01.10.2019 г.

Принята к публикации 14.10.2019 г.

Осуществлена коэкспрессия генов, кодирующих β -глюканазы из *Paenibacillus jamilae* и *Rhizomucor miehei* в системе мейлотрофных дрожжей *Komagataella kurtzmanii*. Были получены рекомбинантные штаммы, продуцирующие одновременно два фермента с суммарной активностью 1132 и 1464 ед/мл за 96 ч культивирования в колбах. Сочетание свойств ферментов позволило добиться существенного расширения диапазона рН β -глюканазной активности, а также приближения значений температурного и рН-оптимума работы ферментов к показателям, оптимальным для использования в кормопроизводстве. Разработан вектор, позволяющий эффективно осуществлять совместную экспрессию генов за счет последовательной интеграции экспрессионных кассет в состав хромосомы реципиентного штамма. Показано также, что изменение соотношения количества генов, интегрированных в хромосому клетки-хозяина, позволяет направленно влиять на суммарные свойства рекомбинантных ферментов.

Ключевые слова: коэкспрессия, β -глюканаза, β -глюкан, *Paenibacillus jamilae*, *Rhizomucor miehei*, *Komagataella kurtzmanii*, *Pichia pastoris*.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-20-28

Мейлотрофные дрожжи широко используются для создания на их основе рекомбинантных штаммов-продуцентов гетерологичных белков, в том числе ферментов. Это обусловлено их биобезопасностью, легкостью молекулярно-генетических манипуляций, высоким уровнем производства секретируемых белков [1–4], способностью достигать высоких плотностей клеток на минимальных средах [5], генетической стабильностью рекомбинантных элементов в процессе длительного культивирования при использовании интегральных векторов [6]. Вышеуказанные свойства

мейлотрофных дрожжей позволяют увеличить выход целевого белка при снижении стоимости производства [7–8].

Чаще всего для высокоуровневой экспрессии белков используют мейлотрофные дрожжи *Pichia pastoris* [9].

Komagataella kurtzmanii – новый вид мейлотрофных дрожжей, родственник *Pichia pastoris* [10], для которого была разработана система экспрессии и показана эффективность данной системы на модельных штаммах-продуцентах гетерологичных белков [11].

Список сокращений: а.о. – аминокислотные остатки; ДНС – 3,5-динитросалициловая кислота (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS); ДНС-метод – метод определения ферментативной активности ксиланазы с ДНС-реактивом; КЖ – культуральная жидкость; ПЦР – полимеразная цепная реакция; YPD-среда – Yeast Extract-Peptone-Dextrose medium; YNB-среда – Yeast Nitrogen Base medium.

Ферментные препараты, созданные на основе рекомбинантных штаммов-суперпродуцентов, широко используются в промышленности и сельском хозяйстве, в частности в качестве добавок, вносимых в корм животных [12].

Одними из наиболее востребованных ферментов, применяемых в кормопроизводстве, являются β -глюканазы – фермент, способный гидролизовать β -глюканы. В птицеводческих и свиноводческих отраслях природный водорастворимый β -глюкан действует как антипитательный агент. Добавка β -глюканаз в корм, содержащий ячмень, улучшает прирост массы тела сельскохозяйственных животных за счет снижения вязкости содержимого тонкой кишки и улучшения усвоения питательных веществ [13–14].

Свойства ферментов, используемых в кормопроизводстве, должны соответствовать ряду требований, диктуемых особенностями технологии производства препаратов и физиологии пищеварения животных. Наиболее важными показателями применяемых ферментов являются следующие: удельная активность, термостабильность, температурный и pH оптимумы их действия, высокая активность в широком диапазоне pH, устойчивость к действию протеолитических ферментов.

Однако свойства природных ферментов не всегда соответствуют требованиям, необходимым для их промышленного использования. Для направленного изменения свойств ферментов применяют различные методы белковой инженерии [15–20].

Одним из подходов к конструированию штаммов-продуцентов является совместная экспрессия (коэкспрессия) двух и более генов. Так, созданы генетические конструкции для наработки слитых белков, разделенных линкером, содержащим сайт распознавания протеазами для последующего разделения двух слитых белков на индивидуальные белки. [21–22]. Однако совместная экспрессия не применялась для качественного улучшения свойств продуктов, производимых штаммами.

В данной работе рассматривается конструирование рекомбинантных дрожжевых штаммов, продуцирующих совместно β -глюканазы из *Rhizomucor miehei* и *Paenibacillus jamilae*. Данные β -глюканазы ранее уже были охарактеризованы [23–24]. Оба фермента обладают высокими и сопоставимыми по величине значениями удельной активности, устойчивостью к пищеварительным ферментам, pH- и *T* (термо)-стабильностью, однако, недостаточно широкий pH и температурный диапазон активности делает нерациональным их использование в кормопроизводстве.

Цель работы – продемонстрировать возможность использования стратегии коэкспрессии генов, кодирующих β -глюканазы из *R. miehei* и *P. jamilae*, для создания рекомбинантных дрожжевых штаммов *K. kurtzmanii*, продуцирующих ферменты, в которых обе β -глюканазы, проявляя синергизм свойств, позволяют получить продукт для кормовых добавок с оптимальными свойствами.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Микроорганизмы, питательные среды, плазмиды

Для генно-инженерных работ был использован штамм *Escherichia coli* XL1-Blue (*endA1 supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac hsdR17 F* [proAB lacIqZ Δ M15 Tn10]), ВКПМ В-9838.

Для экспрессии в дрожжевой системе был использован штамм *K. kurtzmanii* ВКПМ Y-727 и вектор pAOX-cre (ВКПМ В-13406).

LB-среда (0,5% дрожжевой экстракт («Диа-М», Россия), 1% триптон («Диа-М»), 1% NaCl («Хим-Мед», Россия)) была использована для культивирования *Escherichia coli* XL1 Blue. YPD-среда (1% дрожжевой экстракт («Диа-М»), 1,5%-ный триптон («Диа-М»), 2%-ная глюкоза («ХимМед»)) была использована для культивирования *K. kurtzmanii*. YNB-среда была использована для ферментации рекомбинантных штаммов ((NH₄)₂SO₄ – 5 г/л, KH₂PO₄ – 1 г/л, MgSO₄ – 0,5 г/л, NaCl – 0,1 г/л, CaCl₂ – 0,1 г/л, борная кислота – 500 мкг/л, CuSO₄ – 40 мкг/мл, KI – 100 мкг/мл, FeCl₃ – 200 мкг/мл, MnSO₄ – 400 мкг/мл, Na₂MoO₄ – 200 мкг/мл, ZnSO₄ – 400 мкг/мл, биотин – 2 мкг/мл, пантотенат кальция – 400 мкг/мл, фолиевая кислота – 2 мкг/мл, инозит – 2 мкг/мл, никотиновая кислота – 400 мкг/мл, п-аминобензойная кислота – 200 мкг/мл, пиридоксин HCl – 400 мкг/мл, рибофлавин – 200 мкг/мл, тиамин HCl – 400 мкг/мл) (Himedia, Индия)).

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей были использованы программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и NCBI ORF Finder tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Для поиска возможных сигнальных последовательностей – программа SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

Оптимизация кодонов и синтез генов

Оптимизация кодонного состава генов *bg126* (GenBank MN053906) и *bg1R* (GenBank JQ088103.1)

проводились в программе GenScript (<https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis>). Для синтеза генов использовали метод, основанный на олигонуклеотидах и описанный ранее [25].

Конструирование рекомбинантных экспрессионных плазмид

Фрагменты ДНК, кодирующие зрелые β-глюканазы из *R. miehei* (BglR) и *P. jamiclae* (Bgl26), были амплифицированы методом ПЦР с использованием *Pfu* ДНК-полимеразы (Fermentas) и по два праймера для каждой из β-глюканаз: для *R. miehei* (BglR) – BglR-op-f 5'-aagaattctggactctgac-cgacaattac-3' и BglR-op-r 5'-aagcggccgcttattgctgtagaccttaagtagtg-3' и для *P. jamiclae* – Bgl26-op-f 5'-aagaattcgcgtgtaacgtttctgggaaccactcaac-3' и Bgl26-op-r 5'-aagcggccgcttagtagaagtgtacttaaccagctgtatt-3'. Амплифицированные продукты были обработаны эндонуклеазами рестрикции EcoRI и NotI и каждый был клонирован в состав вектора pAOX-cre, в результате чего были получены рекомбинантные плазмиды pAOX-cre-BglR-op и pAOX-cre-Bgl26-op.

Конструирование рекомбинантных штаммов *K. kurtzmanii*

Плазмиды pAOX-cre-BglR-op и pAOX-cre-Bgl26-op были линейаризованы с использованием рестриктазы BglII и трансформированы в клетки *K. kurtzmanii* методом электропорации [11].

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

Для отбора наиболее продуктивных трансформантов и выщепления маркерного гена проводили их культивирование в жидкой ферментационной питательной среде YP (1%-ный дрожжевой экстракт («Диа-М»), 1,5%-ный триптон («Диа-М») с добавлением метанола (3 мас. %) в 96-луночных планшетах для культивирования (Greiner bio-one, Германия) при 30 °С в течение 72 ч на качалке (250 об./мин).

Определение активности β-глюканазы в КЖ проводили с использованием ДНС-метода [26] в 96-луночном планшете. Для этого в каждой лунке смешивали 25 мкл 1%-ного раствора субстрата β-глюкана ячменя в 0,5 М ацетатном буфере (рН 5) и 25 мкл КЖ. Инкубацию проводили при 50 °С 10 мин, после чего добавляли в лунки по 50 мкл раствора ДНС. Планшет прогревали при 99 °С 10 мин и измеряли поглощение окрашенного раствора при длине волны 546 нм. В качестве стандар-

та использовали раствор глюкозы. По результатам ферментации отбирали наиболее продуктивные трансформанты. Клетки отобранных трансформантов рассеивали до отдельных колоний на агаризованную питательную среду YPD. Для дальнейших исследований отбирали колонии, не способные к росту в присутствии антибиотика G418.

Ферментация рекомбинантных штаммов *K. kurtzmanii*

Для получения инокулята штаммы выращивали в течение 24 ч при 28 °С и аэрации 250 об./мин в 50 мл жидкой питательной среды YPD в колбах объемом 500 мл. Полученным инокулятом в соотношении 1:10 засеивали колбы объемом 500 мл со средой YNB (50 мл), содержащей 10 г/л глицерина и 10 г/л CaCO₃, и выращивали при 28 °С и аэрации 250 об./мин в течение 96 ч. Через каждые 24 ч культивирования добавляли 1% метанола. После окончания ферментации определялась активность ферментов в КЖ.

Анализ ферментативной активности

Стандартное определение активности β-глюканазы проводили в 100 мкл, смешивая 50 мкл 0,5%-ного раствора β-глюкана ячменя (Megazyme, США) в 0,5 М трис-НСl буфере (рН 5) и 50 мкл образца фермента. Инкубацию проводили 10 мин при 50 °С.

Восстанавливающие сахара определялись ДНС-методом с использованием глюкозы в качестве стандарта [26].

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

Определение концентрации белка

Концентрацию общего белка в КЖ определяли методом Брэдфорда [27].

Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Электрофорез проводили в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии SDS в камере для вертикального электрофореза Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, США) 1 ч при напряжении 50 В, затем 2–3 ч при напряжении 150 В. Окраску белков проводили с использованием 0,1%-ного раствора Кумасси голубого R250 («Диа-М»).

Характеристики рекомбинантных β-глюканаз

рН-оптимум активности определяли по величине активности ферментов с использованием в качестве субстрата β-глюкана ячменя в буферах:

0,5 М глициновый (рН 2–3), 0,5 М ацетатный (рН 4–6), 0,5 М трис-HCl (рН 7–9).

Температурную зависимость активности исследовали, проводя стандартное определение активности ферментов в диапазоне температур 30–70 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование рекомбинантных дрожжевых штамов

Для коэкспрессии генов, кодирующих ферменты в системе метилотрофных дрожжей *K. kurtzmanii*, был разработан вектор pAOX-cre, экспрессионная кассета которого включала в себя мощный индуцибельный AOX1-промотор (pAOX1) и AOX1-терминатор транскрипции

(ТТАОХ1) *P. pastoris*, сигнальную последовательность α -фактора *Saccharomyces cerevisiae*, а также кассету, фланкированную сайтами lox66 и lox71, в состав которой входил кодирующий ген устойчивости к генетицину (G418) – *kanMX* – под контролем дрожжевого TEF-промотора, и ген *cre*, кодирующий рекомбиназу бактериофага P1 под контролем AOX1-промотора *P. pastoris* (рис. 1).

Использование конструкций на основе вектора pAOX-cre позволило осуществить высокоуровневую экспрессию целевых генов и эффективную секрецию белков, интеграцию экспрессионной кассеты преимущественно с помощью механизма неомологичной рекомбинации (NHEJ) [28], что могло приводить к увеличению числа копий экспрессионной кассеты в составе хромосомы дрожжевого

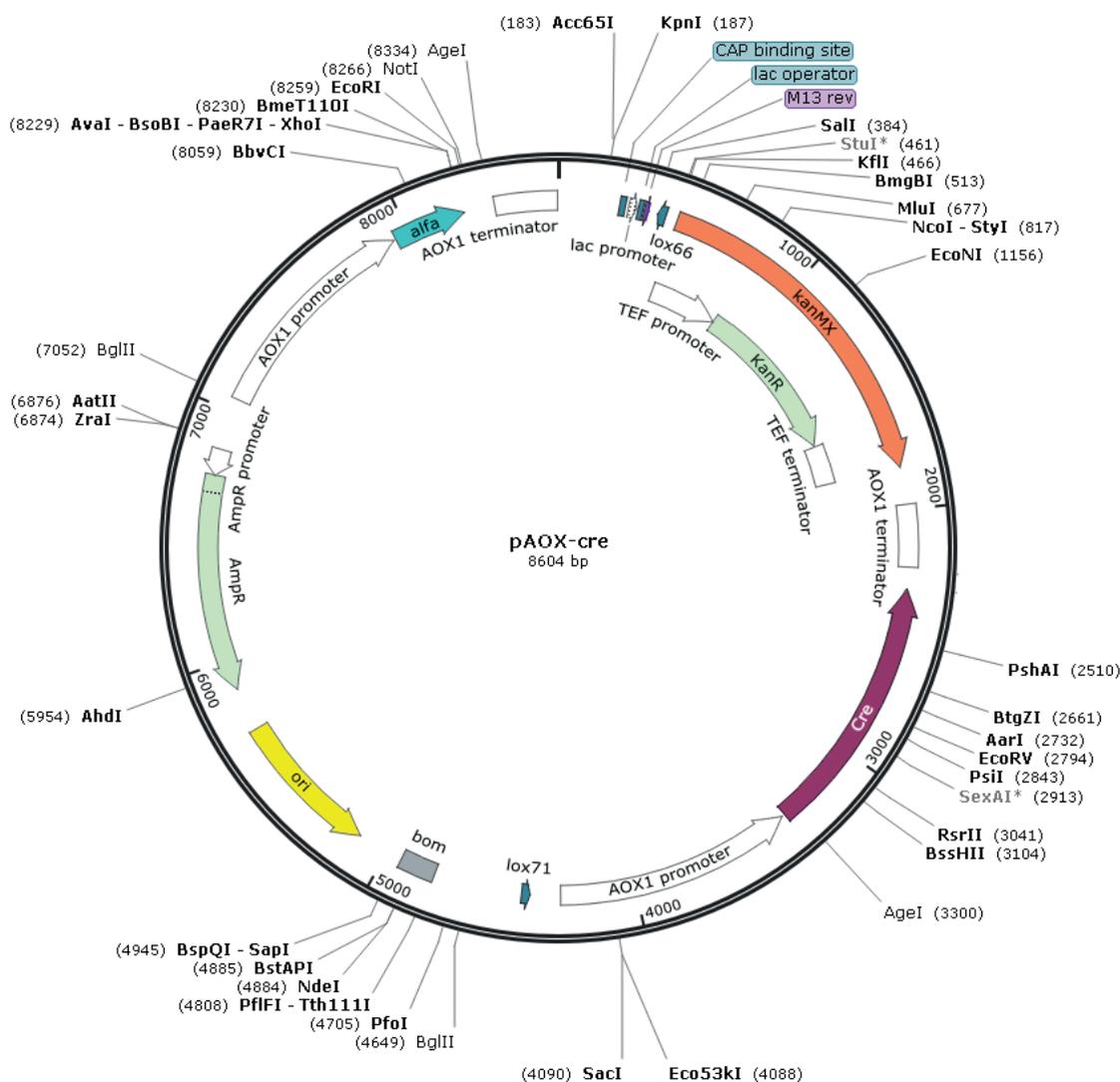


Рис. 1. Физическая карта экспрессионного вектора pAOX-cre. В скобках указано положение сайтов рестрикции на карте вектора

Fig. 1. Physical map of the expression vector pAOX-cre. In parentheses the position of restriction sites is shown on the map of the vector

штамма. Выщепление маркерного гена и гена рекомбиназы происходило благодаря *cre-lox* системе бактериофага P1: индукция метанолом вызывала экспрессию гена *cre* и синтез рекомбиназы, что приводило к рекомбинации и вырезанию фрагмента *cre-kanMX* из хромосомы штамма-хозяина.

Кроме того, выбранная методика позволила выщеплять маркерный ген в одну стадию, отбирая наиболее активные трансформанты.

Таким образом, посредством вектора pAOX-*cre* была достигнута коэкспрессия генов путем последовательной интеграции экспрессионных каскад в состав хромосомы штамма-реципиента.

Нативная эндо-1,3(4)- β -глюканаза из термофильного гриба *Rhizomucor miehei* (ЕС 3.2.1.6) была ранее выделена и охарактеризована [24, 29]. Однако свойства рекомбинантного фермента в экспрессионной системе митотрофных дрожжей исследованы не были. Аминокислотная последовательность эндо-1,3(4)- β -глюканазы из *R. miehei*, а также нуклеотидная последовательность гена, кодирующего белок, доступна в базе данных (GenBank: JQ088103.1). Анализ аминокислотной последовательности фермента с использованием программы SignalP 4.1 позволил определить возможную сигнальную последовательность (19 N-концевых аминокислот) и последовательность зрелого белка (295 аминокислот).

Свойства эндо-1,3,1,4- β -глюканазы из *Paenibacillus jamilae* (ЕС 3.2.1.73) были описаны авторами ранее [23]. Было показано, что белок состоит из 213 аминокислот и 24 остатков предполагаемого сигнального пептида в N-концевой области (GenBank: MN053906). На основании аминокислотных последовательностей были разработаны и синтезированы оптимизированные нуклеотидные последовательности *bglR-op* и *bgl26-op*, представляющие собой области, кодирующие зрелые белки: эндо-1,3(4)- β -глюканазу из *R. miehei* (BglR) и эндо-1,3-1,4- β -глюканазу из *P. jamilae* (Bgl26). Оптимизация нуклеотидных последовательностей проводилась в соответствии с частотой встречаемости кодонов митотрофных дрожжей *P. pastoris* [30].

Оптимизированные нуклеотидные последовательности, кодирующие области зрелых белков BglR и Bgl26, были амплифицированы методом ПЦР с использованием пар праймеров BglR-op-f/BglR-op-r и Bgl26-op-f/Bgl26-op-r и клонированы в единую рамку считывания с сигнальной последовательностью α -фактора вектора pAOX-*cre*. Таким образом были сконструированы экспрессионные плазмиды pAOX-*cre*-BglR-op и pAOX-*cre*-Bgl26-op.

Экспрессионные плазмиды были линеаризованы и трансформированы в клетки *K. kurtzmanii*. Отбор наиболее активных трансформан-

тов и выщепление маркерного гена проводили в процессе ферментации, что позволило отобрать штаммы K-BglR-48 и K-Bgl26-3, показавшие высокую β -глюканазную активность и не способные к росту на питательных средах, содержащих генетицин.

На следующем этапе работы была осуществлена трансформация экспрессионной каскады плазмиды pAOX-*cre*-BglR-op в штамм K-Bgl26-3, а каскады плазмиды pAOX-*cre*-Bgl26-op – в штамм K-BglR-48. Для дальнейших исследований были отобраны наиболее активные трансформанты K-Bgl26-BglR-27 и K-BglR-Bgl26-51, в состав хромосом которых интегрированы одновременно каскады для экспрессии генов *bglR* и *bgl26*, кодирующих β -глюканазы из *R. miehei* и *P. jamilae*.

Ферментативная активность штаммов

Ферментацию отобранных штаммов K-BglR-48, K-Bgl26-3, K-Bgl26-BglR-27 и K-BglR-Bgl26-51 проводили в питательной среде YNB (50 мл) в 500-мл колбах в течение 96 ч. Каждые 24 ч отбирались образцы объемом 1 мл. Уровень секреции ферментов, определяемый по β -глюканазной активности, увеличивался на всем протяжении ферментации. Ферментативная активность через 96 ч культивирования, измеренная при pH 6 и 50 °C, для штамма K-BglR-48 составила 818 ед/мл, для штамма K-Bgl26-3 – 715 ед/мл, для штамма K-Bgl26-BglR-27 – 1132 ед/мл, для штамма K-BglR-Bgl26-51 – 1464 ед/мл. (рис. 2). Таким образом, коэкспрессия генов привела к увеличению общей продуктивности штаммов.

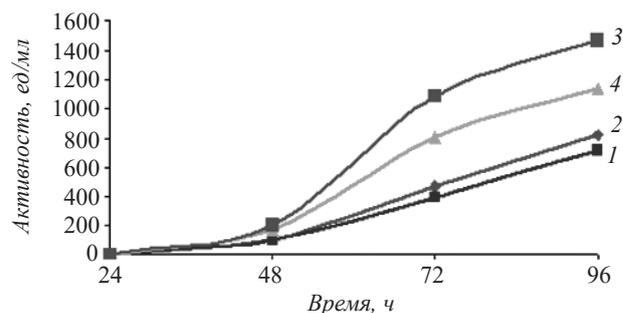


Рис. 2. Зависимость уровня β -глюканазной активности в супернатантах КЖ исследуемых штаммов от времени культивирования: 1 – K-Bgl26-3; 2 – K-BglR-48; 3 – K-BglR-Bgl26-51; 4 – K-Bgl26-BglR-27. Приведены средние значения, полученные в результате проведения трех независимых измерений с учетом погрешности измерения ($p < 0,05$)

Fig. 2. The dependence of the β -glucanase activity in supernatants of cultured fluid strains: 1 – K-Bgl26-3; 2 – K-BglR-48; 3 – K-BglR-Bgl26-51; 4 – K-Bgl26-BglR-27. The data shown in the graphs are the average values obtained as a result of three independent measurements taking into account the measurement error ($p < 0,05$)

Анализ целевых белков КЖ

Методом SDS-PAGE-электрофореза были проанализированы белки, входящие в состав супернатантов КЖ через 72 ч ферментации. Результаты исследований показаны на рис. 3.

На рис. 3 видно, что в составе супернатантов КЖ штамма K-Bgl26-3 присутствует рекомбинантная β -глюкоканазы размером примерно 30 кДа (из *P. jami-lae* Bgl26) и штамма K-BglR-48 – рекомбинантная β -глюкоканазы размером примерно 38 кДа (из *R. mie-hei* BglR). В супернатантах КЖ штаммов K-Bgl26-BglR-27 и K-BglR-Bgl26-51 присутствуют оба белка, но их количественное соотношение разное.

Температурный и pH-диапазон ферментативной активности рекомбинантных β -глюконаз

Такие показатели, как pH- и *T*-диапазон активности, являются основными при выборе ферментов для использования в кормопроизводстве. Это обусловлено особенностями физиологии пищеварения животных.

Так, пищеварение животных с однокамерным желудком начинается с грубого измельчения корма и обильного смачивания его слюной, которая обладает нейтральным значением pH. После прохождения пищевода измельченный корм попадает в желудок,

где значение pH падает до 2–2,5. В желудке происходит последующее разрушение корма с высвобождением простых соединений. Далее питательная субстанция попадает, последовательно, в тонкий и толстый кишечник, где значения pH смещаются в щелочную область и находятся в интервале от 4 до 8. В кишечнике происходит дальнейшее разрушение компонентов корма и всасывание в организм питательных соединений. Важно, чтобы на этом этапе происходило наиболее полное разложение компонентов пищи до метаболизируемых соединений, т.е. ферменты должны работать как можно лучше, при этом обладать широким pH-диапазоном действия.

Кроме того, *T*-оптимум действия ферментов должен находиться максимально близко к температуре тела животных, которая составляет 38–41 °С.

Исследования pH-диапазона активности β -глюконаз показало (рис. 4а), что оптимум pH активности рекомбинантной β -глюконазы Bgl26, секретируемой штаммом K-Bgl26-3, был равен 7. Фермент был активен при pH от 4 до 8 и сохранял более 50% активности при pH от 4,7 до 7,8. При pH <4 ферментативной активности не наблюдалось.

Оптимум pH активности β -глюконазы BglR, секретируемой штаммом K-BglR-48, был равен 5, фермент проявлял активность в диапазоне pH от 2 до 7 и сохранял более 50% активности при pH от 4,2 до 6,5. При pH >7 фермент был неактивен.

Таким образом, рабочий диапазон рекомбинантных β -глюконаз BglR и Bgl26 недостаточно широкий для их эффективного использования в качестве кормовой добавки к комбикормам, так как их активность не охватывает весь необходимый pH-диапазон.

Измерение ферментативной активности в супернатантах культуральных жидкостей штаммов K-BglR-Bgl26-51 и K-Bgl26-BglR-27, продуцирующих одновременно β -глюконазы BglR и Bgl26 показало, что pH-оптимум работы ферментов в обоих случаях равен 6, ферменты активны в диапазоне pH от 2 до 8, активность выше 50% для продуктов штамма K-BglR-Bgl26-51 сохраняется в диапазоне pH от 2,7 до 6,9, а для продуктов штамма K-Bgl26-BglR-27 – от 3,3 до 7,8.

Таким образом, совместная экспрессия генов, кодирующих β -глюконазы BglR и Bgl26 в штаммах K-BglR-Bgl26-51 и K-Bgl26-BglR-27, привела к существенному расширению pH-диапазона активности ферментов. Такой диапазон работы ферментов соответствует требованиям для их использования в качестве кормовых добавок.

Однако рабочий pH-диапазон β -глюконаз совпадал не полностью – для K-BglR-Bgl26-51 наблюдалось некоторое смещение в кислую сторону (pH от 2,7 до 6,9) по сравнению с K-Bgl26-BglR-27 (pH от 3,3 до 7,8).

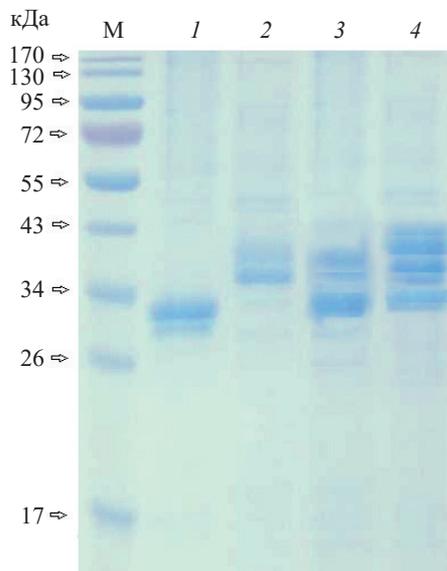


Рис. 3. SDS-PAGE-анализ белков из супернатантов КЖ штаммов: 1 – K-Bgl26-3; 2 – K-BglR-48; 3 – K-Bgl26-BglR-27; 4 – K-BglR-Bgl26-51; М – белковый маркер молекулярной массы

Fig. 3. SDS-PAGE analysis of proteins from supernatants of cultured fluid strains: lane 1 – K-Bgl26-3; lane 2 – K-BglR-48; lane 3 – K-Bgl26-BglR-27; lane 4 – K-BglR-Bgl26-51; M, standard protein molecular weight (Thermo Scientific).

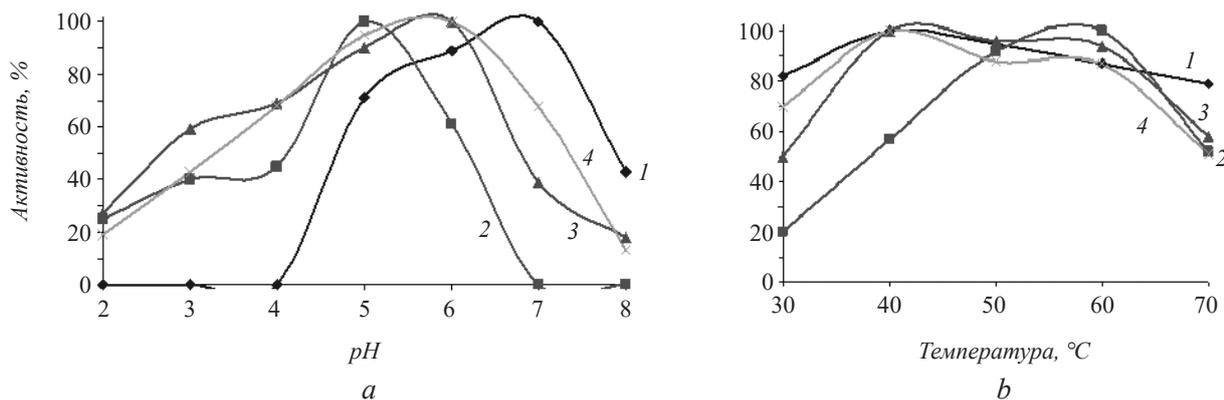


Рис. 4. Влияние pH (a) и температуры (b) на активность ферментов из супернатантов КЖ штаммов: 1 – К-Bgl26-3; 2 – К-BglR-48; 3 – К-BglR-Bgl26-51; 4 – К-Bgl26-BglR-27. На графиках приведены средние значения, полученные в результате проведения трех независимых измерений с учетом погрешности измерения ($p < 0,05$)

Fig. 4. The influence of Ph (a), temperature (b) on the activity of enzymes from supernatants of cultured fluid of strains: 1 – К-Bgl26-3; 2 – К-BglR-48; 3 – К-BglR-Bgl26-51; 4 – К-Bgl26-BglR-27. The data shown in the graphs represent the average value obtained as a result of three independent measurements, taking into account the measurement error ($p < 0.05$)

Изучение T -диапазона активности β -глюко-наз, секретируемых исследуемыми штаммами, показало (рис. 4b), что T -оптимум активности Bgl26 был равен 40–45 °С, при этом в диапазоне температур от 30 до 68 °С активность фермента составляла $\geq 80\%$. T -оптимум активности BglR был равен 58 °С, а в диапазоне температур от 48 до 67 °С активность фермента превышала 80%; T -оптимум ферментативной активности β -глюкоаназ КЖ штамма К-BglR-Bgl26-51 был равен 43 °С, при этом в диапазоне температур от 37 до 65 °С активность была выше 80%; температурный оптимум ферментативной активности β -глюкоаназ КЖ штамма К-Bgl26-BglR-27 был равен 40 °С, в диапазоне температур от 33 до 60 °С активность превышала 80%.

Таким образом, исследования показали, что рабочий диапазон активности β -глюкоаназы из *R. miehei* существенно превышает температуру тела животных, что делает не рациональным использование этого фермента в качестве кормовой добавки. В то же время, рабочий диапазон ферментов, секретируемых в КЖ штаммами К-BglR-Bgl26-51 и К-Bgl26-BglR-27, полученными ко-экспрессией генов, кодирующих β -глюкоаназы из

P. jamaiae и *R. miehei*, соответствовал температуре тела сельскохозяйственных животных. Однако и здесь наблюдается не полное совпадение рабочих диапазонов активности – 37–65 °С для К-BglR-Bgl26-51 и 33–60 °С для К-Bgl26-BglR-27.

Определение удельной активности β -глюкоаназ

Важной характеристикой ферментов, используемых в качестве кормовых добавок, являются значения их удельной активности в диапазоне pH, который соответствует физиологическому значению содержимого кишечника (от 4 до 7) при температуре, близкой к температуре тела животных (38–41 °С).

Значения удельной активности β -глюкоаназ, рассчитанной относительно концентраций общего белка супернатантов КЖ исследуемых штаммов приведены в табл. 1.

Исследования показали, что удельная активность β -глюкоаназ Bgl26 из *P. jamaiae* и BglR из *R. miehei* была критически низкой при pH 4 и 7, соответственно. В то же время, удельная активность ферментов из КЖ штаммов, полученных в результате коэкспрессии генов, были стабильно высокими во всем диапазоне pH, что свидетельствует о

Таблица 1

Значения удельной активности β -глюкоаназ, рассчитанной при pH в диапазоне от 4 до 7 и температуре 40 °С

The values of the specific activity of β -glucanases

Штамм/фермент	Удельная активность (ед/мг) при значениях pH			
	4	5	6	7
К-Bgl26-3/Bgl26	161±5	3660±99	5776±198	5817±167
К-BglR-48/BglR	1643±68	2743±87	1716±77	201±4
К-BglR-Bgl26-51/BglR-Bgl26	1292±55	3429±120	3453±111	2332±89
К-Bgl26-BglR-27/Bgl26-BglR	1005±39	3774±141	4975±176	4438±155

потенциальной возможности их использования в кормопроизводстве.

Однако значения удельной активности для штаммов К-BglR-Bgl26-51 и К-Bgl26-BglR-27 были различными. Это объясняется, по-видимому, разными соотношениями белков в составе КЖ исследуемых штаммов.

Действительно, как показано на рис. 3, в супернатанте культуральной жидкости штамма К-BglR-Bgl26-51 (см. рис. 3, дорожка 4) концентрация BglR превышает концентрацию Bgl26. Для супернатанта культуральной жидкости штамма К-Bgl26-BglR-27 наблюдается обратная тенденция – концентрация Bgl26 больше, чем BglR (см. рис. 3, дорожка 3).

Разным соотношением белков объясняются и различия в свойствах ферментов – в рабочих pH- и T-диапазоне активности β -глюканаз.

Неодинаковое количество белков связано, вероятно, с разным числом копий гетерологичных генов, интегрированных в состав хромосомы штамма-реципиента: в составе хромосомы штамма К-Bgl26-BglR-27 интегрированы две копии гена *bgl26* и одна копия гена *bglR*, а в составе хромосомы штамма К-BglR-Bgl26-51 соотношение обратное – две копии *bglR* и одна копия *bgl26*. Следовательно, справедливо ранее высказанное суждение, что изменяя соотношение генов при их совместной экспрессии можно направленно влиять на суммарные свойства ферментов, секретруемых штаммом-реципиентом.

Итак, была продемонстрирована стратегия совместной экспрессии генов, кодирующих β -глюканазы различного происхождения в системе метилотрофных дрожжей *K. kurtzmanii*, с целью создания промышленно-ценных штаммов, продуцирующих одновременно два фермента, сочетание свойств которых приводит к наиболее полному соответствию технологическим требованиям, предъявляемым к ферментам в кормопроизводстве. Коэкспрессия генов, кодирующих целевые ферменты, экономически более выгодна, чем экспрессия отдельно каждого фермента, так как позволяет за один раунд ферментации получить продукт с заданными свойствами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60717X0179) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Macauley-Patrick S., Fazenda M.L., McNeil B., et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, 22, 249–70. doi: 10.1002/yea.1208
2. Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J., et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.*, 2000, 16, 23–52. doi: 10.1385/MB:16:1:23
3. Hohenblum H., Gasser B., Maurer M., et al. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, 85, 367–75. doi: 10.1002/bit.10904
4. Ahmad M., Hirz M., Pichler H., Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98, 5301–5317. doi: 10.1007/s00253-014-5732-5
5. Wegner G. Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1990, 7, 279–283.
6. Romanos M.A., Scorer C.A., Clare J.J. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 1992, 8, 423–488.
7. Gellissen G. Heterologous protein production in methylotrophic yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, 54, 741–750. doi: 10.1007/s002530000464
8. Higgins D.R., Cregg J.M. Introduction to *Pichia pastoris*. *Methods Mol. Biol.*, 1998, 103, 1–15.
9. Kurtzman C.P. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 36, 11, 1435–1448
10. Naumov G.I., Naumova E.S., Tyurin O.V., Kozlov D.G. *Komagataella kurtzmanii* sp. nov., a new sibling species of *Komagataella (Pichia) pastoris* based on multigene sequence analysis. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 2013, 104(3), 339–347. doi: 10.1007/s10482-013-9956-
11. Тюрин О.В. Разработка системы экспрессии генов на основе метилотрофных дрожжей *Komagataella kurtzmanii*. Дис. ... к.б.н. Гос. НИИ генет. и селек. пром. микроорг. Москва, 2014.
12. Ribeiro T., Lordelo M.M.S., Ponte P.I.P., et al. Levels of endogenous β -glucanase activity in barley affect the efficacy of exogenous enzymes used to supplement barley-based diets for poultry. *Poultry Sci. Association Inc.*, 2011, 1245–1256. doi: 10.3382/ps.2010-01218
13. Almirall M., Esteve-Garcia E. In vitro stability of a β -glucanase preparation from *Trichoderma longibrachiatum* and its effect in a barley based diet fed to broiler chicks. *Animal Feed Sci. Technol.*, 1995, 54(1–4), 149–158. doi: 10.1016/0377-8401(94)00757-Z
14. Choct M. Enzymes supplementation of poultry diets based on viscous cereals in enzymes. *Farm Animal Nutrition*, 2001, 4, 1–15.
15. Pei H., Guo X., Yang W., et al. Directed evolution of a b-1,3-1,4-glucoamylase from *Bacillus subtilis* MA139 for improving thermal stability and other characteristics. *J. Basic Microbiol.*, 2015, 54, 1–10. doi 10.1002/jobm.201400664
16. Zhang X.Y., Ruan H., Mu L., et al. Enhancement of the thermostability of β -1,3-1,4-glucoamylase by directed evolution. *J. Zhejiang University – Sci. A: Appl. Physics Engineering*, 2006, 7(11), 1948–1955. doi: 10.1631/jzus.2006.A1948

17. Mao S., Gao P., Lu Z., et al. Engineering of a thermostable β -1, 3-1, 4-glucanase from *Bacillus altitudinis* YC-9 to improve its catalytic efficiency. *J. Sci. Food Agric.*, 2016, 96(1), 109–115 doi: 10.1002/jsfa.7066.
18. Borriss R., Olsen O., Thomsen K.K., Von Wettstein D. Hybrid *Bacillus* endo-(1,3; 1,4)- β -glucanases: construction of recombinant genes and molecular properties of the gene products. *Carlsberg Res. Commun.*, 1989, 54(2), 41–54.
19. Politz O., Simon O., Olsen O., Borriss R. Determinants for the enhanced thermostability of hybrid (1-3, 1-4)- β -glucanases. *Eur. J. Biochem.*, 1993, 216(3), 829–834.
20. Planas A. Bacterial 1,3-1,4-L-glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1543, 361–382.
21. de Amorim Araújo J., Ferreira T.C., Rubini M.R., et al. Co-expression of cellulases in *Pichia pastoris* as a self-processing protein fusion. *AMB Express*, 2015, 5(1), 84. doi: 10.1186/s13568-015-0170-z
22. Cai H., Zhang T., Zhao M., et al. Co-expression of lipase isozymes for enhanced expression in *Pichia pastoris*. *Letters Appl. Microbiol.*, 2017, 65(4), 33–342. doi: 10.1111/lam.12783
23. Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Калинина А.Н., и др. Экспрессия гена β -глюкоказы из *Paenibacillus jamilae* Vg1 в *Pichia pastoris* и характеристика рекомбинантного белка. *Биотехнология*, 2019, 35(4), 15–23.
24. Boyce A., Walsh G. Production, purification and application-relevant characterisation of an endo-1,3 (4)- β -glucanase from *Rhizomucor miehei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 76(4), 835–841. doi: 10.1021/jf2049799.
25. Gordeeva T.L., Borschevskaya L.N., Sineoky S.P. Improved PCR-based gene synthesis method and its application to the *Citrobacter freundii* phytase gene codon modification. *J. Microbiol. Methods*, 2010, 81(2), 147–152. doi: 10.1016/j.mimet.2010.02.013
26. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3), 426–428.
27. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248–254.
28. Näätäsaari L., Mistlberger B., Ruth C., et al. Deletion of the *Pichia pastoris* KU70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology. *PLoS ONE*, 2012, 7:e39720. doi: 10.1371/journal.pone.0039720
29. Tang Y., Yang S., Yan Q., et al. Purification and characterization of a novel β -1,3-1,4-glucanase (lichenase) from thermophilic *Rhizomucor miehei* with high specific activity and its gene sequence. *J. Agricultural Food Chemistry*, 2012, 60(9), 2354–2361. doi: 10.1021/jf2049799
30. Zhao X., Huo K., Li Y. Synonymous codon usage in *Pichia pastoris*. *Chin. J. Biotechnol.*, 2000, 16, 308–311.

Co-expression of β -Glucanase Genes of Various Origin as an Approach to the Creation of Recombinant Yeast Strains Producing Enzymes with Optimal Properties

L.N. BORSHCHEVSKAYA^{1,*}, T.L. GORDEEVA¹, A.N. KALININA¹, A.S. FEDOROV¹, and S. P. SINEOKY¹

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

*e-mail: larisa.larbor3@yandex.ru

Received September 26, 2019

Revised October 1, 2019

Accepted October 14, 2019

Abstract—The co-expression of genes encoding β -glucanases from *Paenibacillus jamilae* and *Rhizomucor miehei* in the *Komagataella kurtzmanii* methylotrophic yeast system has been carried out. The recombinant strains that simultaneously produced both enzymes with a total activity of 1132 and 1464 units for 96 h of cultivation in flasks were obtained. The combination of enzyme properties made it possible to achieve a substantial extension of the pH range of β -glucanase activity, as well as to bring the temperature and pH optima of the enzymes closer to those optimal for use in feed production. A vector has been developed that allows the efficient simultaneous expression of genes due to the sequential integration of expression cassettes into the recipient strain chromosome. It was also shown that a change in the ratio of the number of genes integrated into the chromosome of the host cell allows to directionally influence the total properties of recombinant enzymes.

Key words: co-expression, β -glucanase, β -glucan, *Paenibacillus jamilae*, *Rhizomucor miehei*, *Komagataella kurtzmanii*, *Pichia pastoris*

Funding—The work was financially supported by the Ministry of Science and Education (Project Unique Identifier RFMEFI60717X0179) using the Multipurpose Scientific Installation of National Bio-Resource Center «All-Russian Collection of Industrial Microorganisms», NRC «Kurchatov Institute» – GOSNIIGENETIKA.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-20-28