

УДК 579.66/577.18

ЭКСПРЕССИЯ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ *Trigonopsis variabilis* В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *Pichia pastoris*

© 2011 г. В. А. Редо, Е. К. Новикова, М. А. Эльдаров

Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312

e-mail: eldarov@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 13.11.2009 г.

Получены эффективные рекомбинантные штаммы *Pichia pastoris*, продуцирующие с высоким выходом функционально-активный гибрид оксидазы D-аминокислот *Trigonopsis variabilis*, слитой с хитин-связывающим доменом хитиназы A1 *Bacillus circulans* (DAOcbd). Исследована зависимость уровней продукции DAOcbd от числа копий “кассеты экспрессии”, интегрированных в АОХ1 локус рекомбинантных штаммов. Показано, что синтезируемая DAOcbd может быть легко очищена и иммобилизована на хитиновых сорбентах и обладала высокой удельной активностью. Созданные штаммы, методы их культивирования, выделения DAOcbd могут быть использованы для разработки технологий получения биокатализаторов в технологических процессах получения 7-аминоцефалоспоровой кислоты.

Оксидазы D-аминокислот (ОДА, КФ 1.4.3.3), выделенные из дрожжей *Trigonopsis variabilis*, *Rhodotorula gracilis* – промышленные ферменты, широко используемые в современных биокаталитических технологиях получения 7-аминоцефалоспоровой кислоты – исходного соединения-предшественника для производства полусинтетических цефалоспориновых антибиотиков 2–4-го поколений [1, 2].

Усовершенствование известных методов получения препаратов этих ферментов, в том числе с помощью технологий рекомбинантных ДНК, представляет несомненный практический интерес. К настоящему времени известны рекомбинантные плазмидные ДНК, направляющие синтез функционально-активных ферментов ОДА *T. variabilis* [3], *R. gracilis* [4] в клетках бактерий [5–7] или дрожжей [8, 9].

Необходимо отметить, что сверхпродукция ОДА токсична для распространенных хозяйских штаммов *Escherichia coli*, поскольку сопряжена с высвобождением токсичного соединения – перекиси водорода и подавлением синтеза клеточной стенки из-за истощения внутриклеточного пула D-аминокислот [5, 6].

Перспективной альтернативой клеткам бактерий как системы экспрессии ОДА являются метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* [10] и *Hansenula polymorpha* [11]. Использование мощных регулируемых промоторов генов утилизации метанола этих дрожжей позволяет легко проводить оптимизацию процессов ферментации рекомбинантных штаммов-продуцентов ОДА, а токсичность экспрессируемых оксидаз может быть устранена за счет локализации синтезируемых ферментов в пероксисомы дрожжевых клеток, содержащих также значительное количество каталазы, нейтрализующей токсичное действие перекиси водорода. В то же время хорошо известно, что используемые в составе биокатали-

заторов препараты ОДА должны быть свободны от примесей каталазы и других посторонних белков, снижающих эффективность биоконверсии цефалоспоринона С. Необходимость получения высокоочищенных препаратов ОДА значительно затрудняет их выделение из биомассы штаммов метилотрофных дрожжей. Этот недостаток, впрочем, может быть легко преодолен за счет создания систем экспрессии вариантов ОДА, модифицированных присоединением различных аффинных доменов, например, олигогистидиновых остатков, и очистки синтезируемых гибридных белков с помощью аффинной хроматографии [9].

Ранее нами была сконструирована рекомбинантная плазмидная ДНК, направляющая в клетках *E. coli* синтез модифицированной ОДА *T. variabilis* слитой с последовательностью хитинсвязывающего домена хитиназы A1 *B. circulans* [12]. Синтезируемый гибридный белок DAOcbd сохранял полную энзиматическую активность ОДА, мог быть легко очищен и иммобилизован на доступных и недорогих хитиновых сорбентах, отличающихся биологической инертностью, экономичностью и стабильностью.

Цель работы – разработка системы экспрессии белка DAOcbd в метилотрофных дрожжах *P. pastoris*.

МЕТОДИКА

Материалы. Эндонуклеазы рестрикции, T4 ДНК-лигаза, Taq-полимераза, Pfu-ДНК-полимераза производства “МБИ Fermentas” (Вильнюс, Литва), “Сибэнзим” (Новосибирск, Россия), микробиологические среды – фирмы “Difco” (США), изопропил-β-D-тио-галактозид, реагенты для электрофореза, другие реактивы – фирмы “Sigma-Aldrich” (США), магнитные хитиновые гранулы для иммобилизации белков с хи-

тин-связывающим доменом — фирмы “New England Biolabs” (США).

Штаммы микроорганизмов. Для конструирования рекомбинантных плазмид использовали штамм *E. coli* XLI-Blue *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F*^{proAB lacIqZ?M15 Tn10 (Tetr)}] (фирма “Stratagene”, США). Экспрессию DAOcbd осуществляли в штамме *P. pastoris* GS115 his4[mut+] (“Invitrogen”, США).

ДНК манипуляции и компьютерные программы. Для конструирования вектора экспрессии гена гибридного белка DAOcbd в *P. pastoris* использовали плазмиду pVR1, обеспечивающую в клетках *E. coli* синтез гибридного белка DAOcbd под контролем T7 промотора и терминатора экспрессионного вектора pET23a [12], и плазмиду pPicVR2, содержащую каскету экспрессии гетерологичных генов для *P. pastoris*, включающую промотор AOX1 *P. pastoris* и терминатор TEF1 *Ashbya gossypii*. Плаزمида pPicVR2 также несет маркерный ген *Sh-ble* из *Streptoalloteichus hindustanus* под контролем промотора гена TEF1 и терминатора гена *CYC1 Saccharomyces cerevisiae*, определяющий устойчивость к зеоцину рекомбинантных штаммов *P. pastoris*, трансформированных плазмидой pPicVR2 и ее производными.

Выделение РНК и геномной ДНК из дрожжей, плазмидной ДНК, ПЦР-амплификацию, конструирование плазмид и их анализ проводили с использованием известных методов генетической инженерии [13]. Определение нуклеотидных последовательностей ПЦР-фрагментов и плазмид проводили путем автоматического секвенирования с помощью набора ABIPrizm 3100 DNA Sequencer с использованием набора Applera “Fluorescent Big Dye Cycle Sequencing Kit”. Нуклеотидные последовательности анализировали с помощью пакета программ VectorNTI8 [14] (“Invitrogen”, США).

Конструирование вектора для экспрессии DAOcbd в *P. pastoris*. Для конструирования вектора pVR2, обеспечивающего многокопийную интеграцию метанол-индуцируемой каскеты экспрессии гена гибридного белка DAOcbd в *P. pastoris* NdeI/XhoI фрагмент размером 1000 п.н. плазмиды pVR1, кодирующий нужный ген, встраивали в NdeI/XhoI вектор pPicVR2.

Трансформация *P. pastoris*. Мультикопийные интегративные трансформанты *P. pastoris* получали путем электропорации клеток штамма GS115 линейризованной плазмидой pVR2 с последующей селекцией вариантов на чашках с различными концентрациями зеоцина. Приготовление электрокомпетентных клеток и саму процедуру электропорации осуществляли как описано [15]. После электропорации клетки инкубировали 1 ч при 30°C в 1 мл 1 М сорбитола и высевали на чашки с твердой средой, содержащей 1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 2% глюкозы и 1 М сорбитола, а также различные концентрации зеоцина (100, 500, 1000 и 2000 мкг/мл). Отбор мультикопийных

интегрантов и селекцию Mut+ клонов проводили в соответствии с рекомендациями фирмы Invitrogen [15].

Культивирование трансформантов. Индивидуальные клоны трансформантов и исходный реципиентный штамм *P. pastoris* GS115 культивировали в 25 мл среды, содержащей 1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 100 мМ калий-фосфатного буфера, pH 6.0, 1.34% дрожжевых азотистых оснований [15] в колбах на 250 мл в течение 16 ч при 29°C до ОП ~ 3–5 ед. Клетки собирали центрифугированием при 3000 g 5 мин и ресуспендировали в 100 мл этой же среды с добавлением 1% метанола [15], доводя оптическую плотность культур (ОП₆₀₀) до 1.0. Дальнейшее культивирование проводили в 1 л колбах 72 ч, добавляя через каждые 24 ч в среду 1 мл метанола для поддержания стабильной индукции с периодическим отбором проб для оценки уровня экспрессии DAOcbd.

Селекция трансформантов. Отобранные Mut+ трансформанты штамма GS115, устойчивые к зеоцину, анализировали на наличие вставки гена DAOCBD методом ПЦР-скрининга [15] с праймерами DAO1 5'-GGCCGCTAAAGGTTTGGAC-3' и DAO2 5'-TCCAGGATTGTCCACGATGA-3'.

Качественный анализ экспрессии DAOcbd в отобранных клонах проводили путем определения активности ОДА в неочищенных экстрактах клеток, выращенных в условиях индукции индивидуальных трансформантов с помощью теста, основанного на детекции перекиси водорода [16]. Для этого осажденные в микроцентрифужных пробирках клетки из 2 мл культуры ресуспендировали в 500 мкл буфера, содержащего 50 мМ натрий-фосфата, pH 7.4; 1 мМ фенил-метил-сульфонил фторида; 1 мМ ЭДТА; 5% глицерина и разрушали путем интенсивного встряхивания на вортексе с равным объемом стеклянных бус (0.5 мм) с периодическим охлаждением проб в ледяной бане. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 14000 g, 10 мин, +4°C. Осветленный супернатант инкубировали в течение часа при интенсивном встряхивании на холоду с 50 мкл суспензии покрытых хитином магнитных гранул, предварительно двукратно промытых в 500 мкл буфера СВ (500 мМ NaCl; 20 мМ Трис-НСl, pH 8.0; 1 мМ ЭДТА; 0.5% Тритон X-100). Гранулы осаждали магнитом, промывали трехкратно буфером СВ и добавляли 1 мл насыщенного кислородом буфера для определения активности ОДА, содержащего 200 мМ D-аланина, 0.86 мМ дианизидина, 50 мМ фосфатный буфер, pH 8.0, пероксидазу хрена 0.5 мг/мл. Быстрое развитие бордового окрашивания свидетельствует о наличии иммобилизуемой на хитиновых магнитных частицах функционально-активной ОДА.

Определение активности DAOcbd в ходе роста культуры. Динамику накопления активности ОДА у “положительных” клонов исследовали с помощью теста, основанного на определении концентрации кетокислоты [16]. Для этого 50 мкл грубых экстрак-

тов, полученных из клеток, отобранных на разных стадиях культивирования, инкубировали с 250 мкл 10 mM D-аланина в 50 mM фосфатном буфере, pH 8.0, в течение 15 или 30 мин, реакцию останавливали добавлением 100 мкл насыщенного раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 2 н. HCl и через 5 мин к раствору добавляли 300 мкл 3 M NaOH и 2.5 мл дистиллированной воды. После инкубации в течение 10 мин при комнатной температуре измеряли поглощение раствора при 550 нм, которое сравнивали с калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных концентраций пиридиноградной кислоты.

Оценку уровня продукции DAOcbd проводили, пересчитывая известное из данных определения удельной активности содержание DAOcbd на общее содержание белка во фракции грубых экстрактов, определенное по модифицированному методу Брэдфорд [17].

Определение копийности вставок у трансформантов *P. pastoris*. Оценку числа копий интегрированной плазмиды pVR2 в полученных трансформантах осуществляли методом Саузерн-гибридизации. Выделенные по стандартной методике [18] препараты геномной ДНК гидролизовали совместно рестриктазами BamHI и XhoI. Разделенные в 1% агарозном геле образцы переносили на мембрану HybondN+ и гибридизовали с меченым α^{32} дАТФ с помощью набора DecaLabel™ DNA Labeling Kit (“MBI Fermentas”, Литва) BamHI/XhoI фрагментом 2000 п.н. плазмиды pVR2, содержащим промотор AOX1 и ген *DAOcbd*. Мембрану сканировали с помощью прибора Typhoon™ 9400 (GE Healthcare, США) и проводили количественную оценку интенсивности сигналов гибридизации с помощью программы Image Quant.

Анализ уровней мРНК гена *DAOcbd*. Выделение суммарной РНК из дрожжевых клеток проводили путем обработки экстрактов клеток кислым фенолом в присутствии гуанидин тиоцианата [19]. Ана-

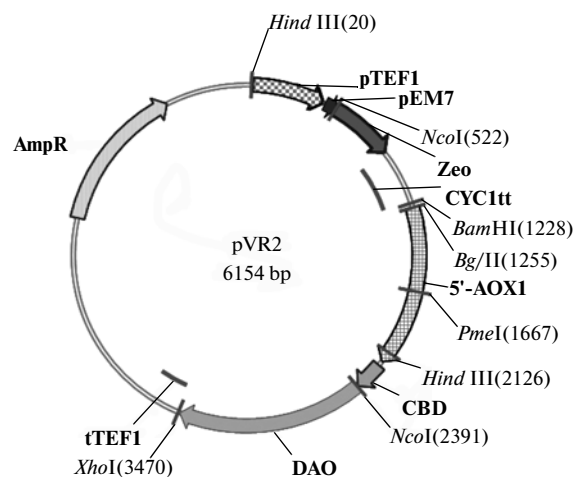


Рис. 1. Физическая и генетическая карта вектора pVR2. Обозначено положение кодирующих областей доменов гена *DAOcbd* (CBD и DAO), промотора гена алкогольоксидазы *P. pastoris* (5'-AOX1); терминатора транскрипции гена *TEF1 A. gossypii* (tTEF1); гена устойчивости к зеоцину (zeo) промотора гена *TEF1 S.cerevisiae* (pTEF1), маркерного гена устойчивости к ампициллину (*Amp*) и некоторых уникальных сайтов рестрикции.

лиз полученных препаратов проводили с помощью Нозерн-блоттинга при использовании денатурирующего фореза в агарозном геле, содержащем формальдегид (2.2 M), по стандартной методике [19]. Мембрану гибридизовали с мечеными ПЦР фрагментами, соответствующими кодирующим последовательностям генов *GPD P. pastoris* и *DAO*, полученными с использованием праймеров GPD1 5'-GCATTGGAGACAATGTTCAAGTCAG-3' и GPD2 5'-AGATTATTGGAAACCACCAGAATCG-3' (ген *GPD P. pastoris*) и DAO1/DAO2 (см. выше, ген *DAO T. variabilis*).

Электрофорез белков. Анализ белковых экстрактов рекомбинантных штаммов дрожжей и фракции

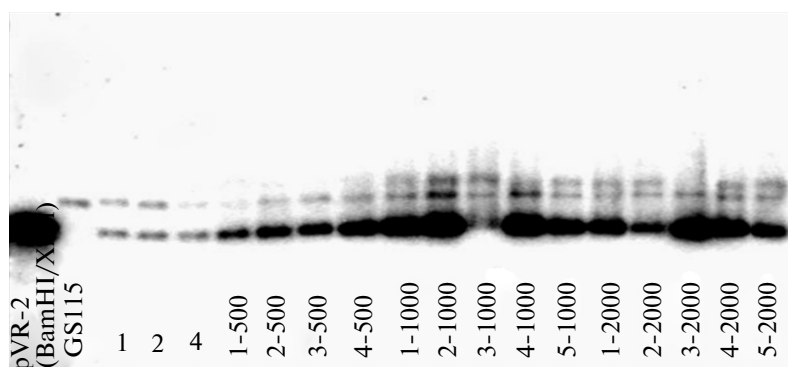


Рис. 2. Саузерн-гибридизация препаратов геномной ДНК трансформантов *P. pastoris*. Обозначения дорожек – pVR2(BamHI/XhoI) – 2000 п.н. фрагмент плазмиды pVR2, включающий промотор AOX1 и ген *DAOcbd*, GS115 – препарат геномной ДНК штамма GS115, далее – номера клонов, отобранных на чашках с различной концентрацией зеоцина: 1–4 – 100 мкг/мл, 1–4-500 – 500 мкг/мл, 1–5-1000 – 1000 мкг/мл, 1–5-2000 – 2000 мкг/мл.

Таблица 1. Копийность интегративных трансформантов *P. pastoris* GS115/pVR2

№ клона	Число копий вставки pVR2	№ клона	Число копий вставки pVR2
GS115	0	2-1000	23
1	2	3-1000	3
2	3	4-1000	31
4	3	5-1000	28
1-500	5	1-2000	25
2-500	10	2-2000	6
3-500	9	3-2000	24
4-500	15	4-2000	21
1-1000	20	5-2000	11

белков, полученные на различных стадиях очистки DAOcbd, проводили с помощью электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) по методу Лэммли [20]. Окраску гелей осуществляли с помощью красителя PageBlue (“MBI Fermentas”, Литва).

Количественное определение белка DAOcbd, продуцируемое различными клонами трансформантов *P. pastoris*, определяли также с помощью Вестерн-блоттинга [13]. Перенесенные на мембрану Immobilon P белки инкубировали с мышиными моноклональными антителами против хитин-связывающего домена хитиназы A1 (New England Biolabs, США), за-

тем инкубировали со вторичными антителами кролика против иммуноглобулинов мыши, меченными пероксидазой хрена (“Promega L”, США). Связавшиеся с антителами белки визуализировали с помощью набора ECL и проводили оценку интенсивности сигналов с помощью прибора Typhoon™ 9400 (GE Healthcare, США).

В качестве стандарта использовали разведения аффинно-выделенного белка DAOcbd.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Селекция трансформантов *P. pastoris*. Плазмида pVR2 (рис. 1) содержит ген гибридного белка DAOcbd под контролем промотора AOX1 *P. pastoris*, терминатора TEF1 *A. gossypii*, а также “кассету экспрессии” гена *Sh-Ble*, обеспечивающего устойчивость к зеоцину рекомбинантных штаммов *P. pastoris*, трансформированных pVR2. Линеаризованная по расположенному в промоторе AOX1 уникальному сайту PmeI плазмида pVR2 должна интегрироваться в AOX1 locus с образованием моно- и мультикопийных tandemных интегрантов. Мультикопийные интегранты при этом могут быть отобраны путем селекции на чашках, содержащих повышенную концентрацию зеоцина.

Отобранные из коллекции трансформантов штамма *P. pastoris* GS115 плазмидой pVR2 mut+ клоны, устойчивые к различным концентрациям зеоцина, анализировали на наличие нужной вставки методом ПЦР-скрининга. Отобранные клоны далее исследо-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

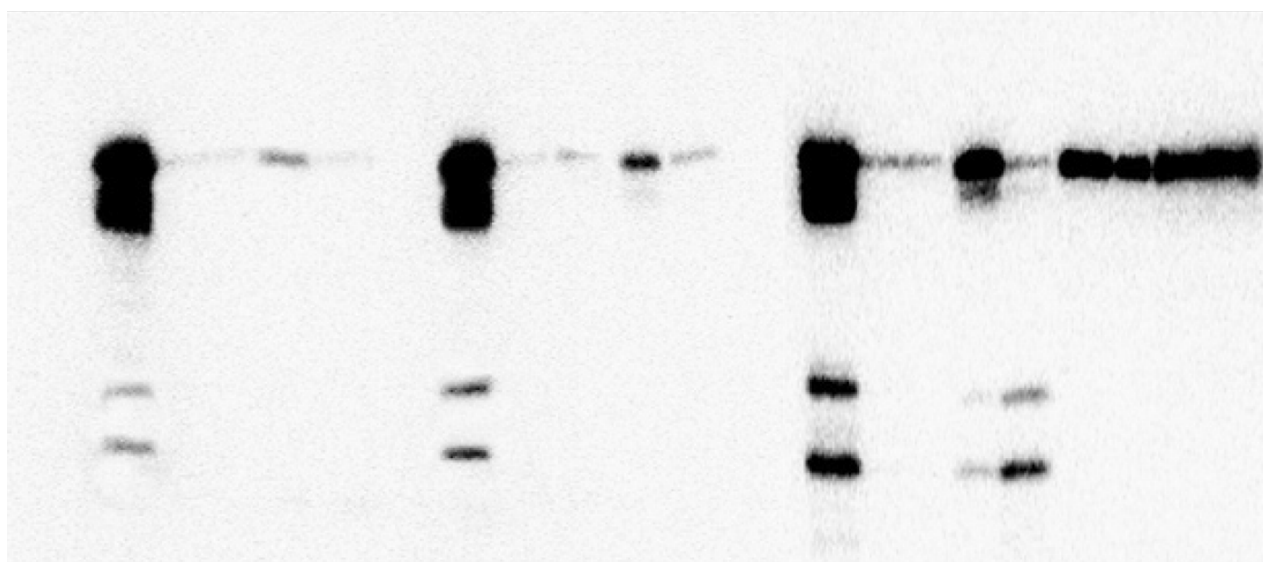


Рис. 3. Вестерн блот анализ динамики экспрессии гена *DAOcbd* в трансформантах *P. pastoris*/pVR2. Дорожки: 1, 7, 13 – штамм GS115 (отрицательный контроль), 2, 8, 14 – клон № 4; 3, 9, 15 – клон № 4-2000; 4, 10, 16 – клон № 3-2000; 5, 11, 17 – клон № 1-500; 6, 12, 18 – клон № 2-1000.

По времени индукции, дорожки 1–6 – 24 ч, 7–12 – 48 ч, 13–18 – 72 ч. Дорожки 19–22 – аффинно-очищенная DAOcbd, выделенная из штамма *E. coli* – продуцента, 3, 1, 2 и 4 мкг соответственно.

вали на способность к экспрессии функционально-активной DAOcbd в качественном тесте, основанном на детекции выделяемой в процессе оксидазной реакции перекиси водорода (см. “Методику”).

Отобранные “положительные” трансформанты подвергали дальнейшему анализу для исследования структуры локуса AOX1 и числа копий “кассеты экспрессии”.

“Копийность” трансформантов *P. pastoris*. Генномную ДНК полученных клонов гидролизовали по сайтам BamHI/XhoI и после разделения в геле и переноса на фильтр образцы гибридизовали с меченой пробой, соответствующей промотору гена AOX1, слитому с геном DAOcbd. Использование такой пробы позволяет оценить копийность вставки по интенсивности сигнала гибридизации от “векторного” фрагмента AOX1–DAOcbd по отношению к внутреннему контролю, которым в нашем случае является хромосомный ген AOX1.

Результаты гибридизации (рис. 2) позволили детектировать во всех образцах два характерных фрагмента разной интенсивности, что свидетельствует о тандемной организации вставки. Проведенная с помощью программы Image Quant оценка копийности вставки плазмиды pVR2 показала, что она колеблется в широких пределах – от 2–3 до 21–23 копий на геном (табл. 1).

Динамика экспрессии DAOcbd. Отобранные трансформанты выращивали в колбах в условиях индукции промотора AOX1, определяя при этом плотность культуры и активность оксидазы для выявления зависимости между числом копий интегрированной плазмиды pVR2, параметрами культивирования и уровнем продукции DAOcbd.

Электрофоретический анализ неочищенных белковых экстрактов полученных штаммов показал, что синтезируемая DAOcbd является мажорным белком растворимой фракции в экстрактах клонов с “низкой” и “средней” копийностью. Проведенный с помощью Вестерн-блоттинга (рис. 3) количественный анализ уровня продукции с DAOcbd в полученных трансформантах позволил установить (табл. 2), что “высококопийные” клоны отличались относительно низким уровнем оксидазной активности, а наибольшей продуктивностью обладали клоны с количеством копий pVR2 от 3 до 5 на геном.

Эти данные хорошо коррелировали с динамикой накопления активности DAOcbd в ходе культивирования (рис. 4). Удельная активность выделенных из полученных экстрактов на хитиновом сорбенте препаратов DAOcbd составила около 87 Е/мг, что соответствует известной из литературных данных удельной активности нативной ОДА *T. variabilis*.

Для выяснения возможных причин сниженной экспрессии в клонах с “высокой” копийностью мы оценили уровни мРНК DAOcbd в различных штаммах. Уровни мРНК гена DAOcbd у мультикопийных и низкокопийных трансфор-

Таблица 2. Уровень продукции DAOcbd (% от растворимого белка клетки) у трансформантов *P. pastoris* с различной “копийностью” вставки (по данным Вестерн-блот анализа*)

№ клона	DAOcbd, %	№ клона	DAOcbd, %
GS115 (1)	0	2-1000 (2)	0.60
4 (1)	4.55	3-2000 (2)	0.60
1-500 (1)	1.25	4-2000 (2)	0.55
2-1000 (1)	0.15	GS115 (3)	0
3-2000 (1)	0.25	4 (3)	12.40
4-2000 (1)	0.10	1-500 (3)	7.20
GS115 (2)	0	2-1000 (3)	1.20
4 (2)	6.70	3-2000 (3)	1.00
1-500 (2)	2.65	4-2000 (3)	1.15

* (1), (2) и (3) – пробы, отобранные через 24, 48 и 72 ч инкубации.

мантов оказались одинаково высокими (рис. 5). Их сопоставление с уровнями мРНК конститутивного гена GAPDH показало, что увеличение копийности вставки в нашем случае приводит лишь к незначительному увеличению уровней мРНК гена DAOcbd.

В настоящей работе получены эффективные штаммы *P. pastoris* GS115, продуцирующие с высоким выходом функционально-активный гибридный белок оксидазы D-аминокислот *T. variabilis*,

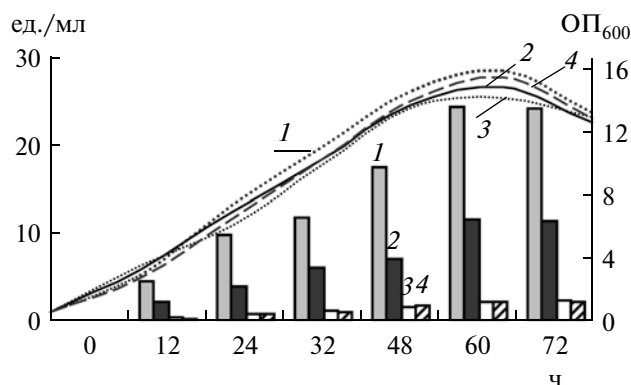


Рис. 4. Динамика роста биомассы и активности ОДА в ходе культивирования трансформантов *P. pastoris*/pVR2 с различной “копийностью”. Гистограмма – активность фермента (ед./мл), график – накопление биомассы (ОП₆₀₀): 1 – клон № 4; 2 – клон № 1-500; 3 – клон № 2-1000; 4 – клон № 4-2000.

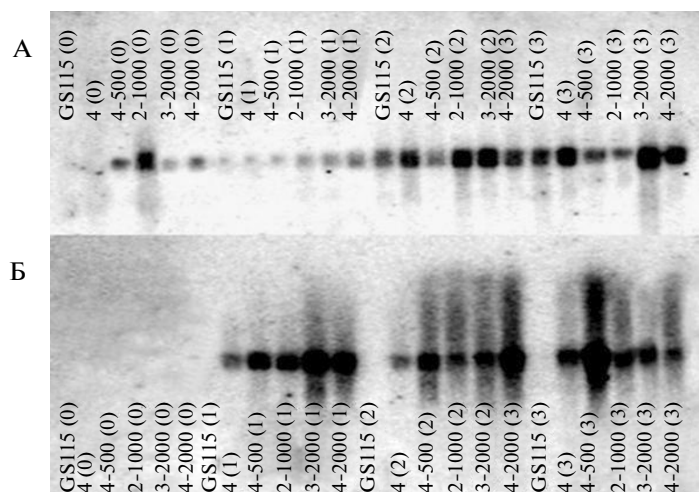


Рис. 5. Нозерн-блот анализ динамики экспрессии гена *DAOcbd* в трансформантах *P. pastoris*/pVR2. Обозначения – GS115 – реципиентный штамм, № 4, № 4-500, № 2-1000, № 3-2000, № 4-2000 – клоны трансформантов, отобранных на чашках с разной концентрацией зеоцина. Пробы отбирали до начала индукции (0), и через 24 (1) 48 (2) и 72 ч (3) после начала индукции: а – гибридизация с зондом GPD, б – с зондом *DAOcbd*.

слитой с хитинсвязывающим доменом хитиназы A1 *B. circulans*. Выход *DAOcbd* при культивировании в колбах составил 45000 Е (или 500 мг) на литр культуры при уровне продукции целевого фермента порядка 10% от растворимого белка рекомбинантного штамма. Таким образом, по своей эффективности полученные штаммы заметно превосходят полученные другими авторами штаммы *P. pastoris*, продуцирующие варианты ОДА *T. variabilis* [9].

Возможные причины более эффективной экспрессии белка *DAOcbd* в полученных нами штаммах достаточно разнообразны и могут заключаться как в особенностях конструкции вектора экспрессии, так и в повышенной устойчивости белка *DAOcbd* к протеолитической деградации за счет стабилизирующего влияния N-концевого СВД-домена.

Нам не удалось обнаружить прямой зависимости между копийностью вставки и уровнем синтеза *DAOcbd* в полученных штаммах. Более того, в штаммах с высокой копийностью уровень синтеза *DAOcbd* был заметно ниже, чем в штаммах со средней копийностью. Известно, впрочем, что увеличение копийности вставки зачастую [21–23], но отнюдь не всегда [24], позволяет повысить уровень продукции целевых белков в рекомбинантных штаммах *P. pastoris*.

Тем не менее, уже полученные штаммы *P. pastoris* достаточно перспективны для отработки методов их культивирования в больших объемах и получения иммобилизованных препаратов гибридного фермента для непосредственного использования в технологических процессах получения 7-аминоцефалоспоровой кислоты.

Работа выполнена при финансовой поддержке Роснауки (Госконтракт 02.512.11.2211).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хороненкова С.В., Тушков В.И. // Успехи биол. химии. 2008. Т. 48. С. 359–376.
2. Riethorst W., Reichert A. // *Chimia*. 1999. V. 53. P. 600–607.
3. Serizawa N., Nakagawa K., Haneishi T., Kamimura S., Naito A. // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 1980. V. 33. P. 585–590.
4. Pilone M.S., Pollegioni L., Casalin P., Curti B., Ronchi S. // *Eur. J. Biochem.* 1989. V. 180. P. 199–204.
5. Lin L., Chien H.R., Wang W., Hwang T., Fu H., Hsu W. // *Enzyme Microbial. Technol.* 2000. V. 27. P. 482–491.
6. Molla G., Vegezzi C., Pilone M.S., Pollegioni L. // *Protein Expr. Purif.* 1998. V. 14. P. 289–294.
7. Khang Y.H., Kim I.W., Hah Y.R., Hwangbo J.H., Kang K.K. // *Biotechnol. Bioeng.* 2003. V. 82. P. 480–488.
8. Isoai A., Kimura H., Reichert A., Schorgendorfer K., Nikaido K., Tohda H., Giga-Hama Y., Mutoh N., Kumagai H. // *Biotechnol. Bioeng.* 2002. V. 80. P. 22–32.
9. Zheng H., Wang X., Chen J., Zhu K., Zhao Y., Yang Y., Yang S., Jiang W. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 70. P. 683–689.
10. Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J., Higgins D.R. // *Mol. Biotechnol.* 2000. V. 16. P. 23–52.
11. Houard S., Heinderyckx M., Bollen A. // *Biochimie*. 2002. V. 84. P. 1089–1093.
12. Редо В.А., Эльдаров М.А., Жгун А.А., Хатунцева С.А., Зейналов О.А., Скрябин К.Г. Патент РФ № 2310688. 2007.

13. Sambrook J., Russel D.W. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 999 p.
14. Lu G., Moriyama E.N. // Brief Bioinform. 2004. V. 5. P. 378–388.
15. EasySelect Pichia Expression Kit. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris*. 1997–2001, Invitrogen Corp. 95 p.
16. Nagata Y., Shimojo T., Akino T. // J. Biochem. 1988. V. 20. P. 1235–1238.
17. Zor T., Selinger Z. // Anal. Biochem. 1996. V. 236. P. 302–308.
18. Scorer C.A., Clare J.J., McCombie W.R., Romanos M.A., Sreekrishna K. // Biotechnology. 1994. V. 12. P. 181–184.
19. Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156–159.
20. Laemli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
21. McGrew J.T., Leiske D., Dell B., Klinke R., Krasts D., Wee S.F., Abbott N., Armitage R., Harrington K. // Gene. 1997. V. 187. P. 193–200.
22. Clare J.J., Romanos M.A., Rayment F.B., Rowedder J.E., Smith M.A., Payne M.M., Sreekrishna K., Henwood C.A. // Gene. 1991. V. 105. P. 205–212.
23. Vassileva A., Chugh D.A., Swaminathan S., Khanna N. // Protein Expr. Purif. 2001. V. 21. P. 71–80.
24. Hohenblum H., Gasser B., Maurer M., Borth N., Mattanovich D. // Biotechnol. Bioeng. 2004. V. 85. P. 367–375.

Expression of Modified Oxidase of D-aminoacids of *Trigonopsis variabilis* in Methylophilic Yeasts *Pichia pastoris*

V. A. Redo, E. K. Novikova, and M. A. Eldarov

Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

e-mail: eldarov@biengi.ac.ru

Received November 13, 2009

Abstract—Effective recombinant strains *Pichia pastoris* that produce functionally active hybrid of *Trigonopsis variabilis* D-aminoacids bond with chitin-connecting domain of chitinase A1 of *Bacillus circulans* (DAOcbd) were obtained. The dependence of DAOcbd production levels from production of the number of copies of “expression cassette” integrated in the AOX1 locus of recombinant strains was studied. It was indicated that synthesized DAOcbd may be easily purified and immobilized on chitin sorbents and possessed high specific activity. Produced strains and methods of their cultivation and DAOcbd extraction may be used for development of technologies of obtaining of biocatalyzers in technological processes of obtaining of 7-aminocephalosporane acid.