

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ-2022-8-21

Оригинальное исследование

Клонирование и экспрессия гена маннаназы *Thermothielavioides terrestris* в *Komagataella phaffii*

А.В. Задорожный^{1, 2}, Е.Ю. Павлова², В.С. Ушаков², Н.В. Богачева^{1, 2}, В.Н. Шляхтун², А.С. Розанов², М.Е. Воскобоев², А.В. Коржук^{1, 2}, Д.С. Новикова³, С.В. Банникова^{1, 2}, И.А. Мещерякова^{1, 2}, А.Р. Васильева^{1, 2}, А.В. Брянская^{1, 2}, Д.В. Бочков², А.А. Шипова², Т.Н. Горячковская^{1, 2}, С.Е. Пельтек^{1, 2}

Аннотация: Для экспрессии в дрожжах *Komagataella phaffii* клонирован ген маннаназы *Thermothielavioides terrestris* в состав плазмиды pPZL. Проведены трансформация полученных конструкций в клетки *Escherichia coli* XLblue и ПЦР-скрининг клонов, несущих конструкции с геном маннаназы *Thermothielavioides terrestris*. Полученная конструкция секвенирована и ей трансформированы дрожжи штамма *K. phaffii* T07. Показано, что в четвертую хромосому генома специально отобранного клона № 42 в район АОХ1-промотора внедрена последовательность гена *mannanase_Thermothielavioides_terrestris*. Ген устойчивости к антибиотику зеоцину в отобранном клоне № 42 отсутствовал. Таким образом, клон № 42 может быть применен в промышленности в качестве штамма-продуцента фермента маннаназы. Произведена наработка фермента и изучены его свойства. Разработана методика очистки фермента для получения ферментных препаратов. Оптимум рН β-маннаназы составляет 2.5–6.0. Полученный ферментный препарат термостабилен, проявляет высокую активность до 80 °С. Температурный оптимум – 50 и 70 °С.

Ключевые слова: маннаназа; *Komagataella phaffii*; гетерологическая экспрессия; фермент; штамм-продуцент.

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства по теме «Создание высокотехнологичного производства высококачественных растительных пищевых белков» (соглашение о предоставлении из федерального бюджета субсидии на развитие кооперации государственного научного учреждения и организации реального сектора экономики в целях реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства № 075-11-2020-036 от 15.12.2020) в рамках Постановления Правительства РФ от 9 апреля 2010 г. № 218 на базе ИЦиГ СО РАН. Авторы выражают благодарность БРК «Коллекция микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии», финансируемой из средств проекта FWNR-2022-0022.

Для цитирования: Задорожный А.В., Павлова Е.Ю., Ушаков В.С., Богачева Н.В., Шляхтун В.Н., Розанов А.С., Воскобоев М.Е., Коржук А.В., Новикова Д.С., Банникова С.В., Мещерякова И.А., Васильева А.Р., Брянская А.В., Бочков Д.В., Шипова А.А., Горячковская Т.Н., Пельтек С.Е. Клонирование и экспрессия гена маннаназы *Thermothielavioides terrestris* в *Komagataella phaffii*. Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;8(4):344-351. DOI 10.18699/LettersVJ-2022-8-21

Original article

Heterologous expression of the *Thermothielavioides terrestris* mannanase gene in the *Komagataella phaffii* genome

A.V. Zadorozhny^{1, 2}, E.Yu. Pavlova², V.S. Ushakov², N.V. Bogacheva^{1, 2}, V.N. Shlyakhtun², A.S. Rozanov², M.E. Voskoboev², A.V. Korzhuk^{1, 2}, D.S. Novikova³, S.V. Bannikova^{1, 2}, I.A. Mescheryakova^{1, 2}, A.R. Vasilieva¹, A.V. Bryanskaya^{1, 2}, D.V. Bochkov², A.A. Shipova², T.N. Goryachkovskaya^{1, 2}, S.E. Peltek^{1, 2}


Abstract: For expression in the yeast *Komagataella phaffii*, the *Thermothielavioides terrestris* mannanase gene was cloned. This gene was cloned into the pPZL plasmid, the resulting constructs were transformed into *Escherichia coli* XLblue cells, and clones carrying constructs

¹ Курчатовский геномный центр Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Акционерное общество «Эфирное», Алексеевка, Белгородская область, Россия
Efirnoe Joint-Stock Company, Alekseevka, Belgorod region, Russia

 alla@bionet.nsc.ru

 Задорожный А.В., Павлова Е.Ю., Ушаков В.С., Богачева Н.В., Шляхтун В.Н., Розанов А.С., Воскобоев М.Е., Коржук А.В., Новикова Д.С., Банникова С.В., Мещерякова И.А., Васильева А.Р., Брянская А.В., Бочков Д.В., Шипова А.А., Горячковская Т.Н., Пельтек С.Е., 2022

with the *Thermothielavioides terrestris* mannanase gene were screened by PCR. The resulting construct was sequenced and transformed into the *K. phaffii* T07. It was shown that we introduced the mannanase *Thermothielavioides terrestris* gene sequence into the AOX1 promoter region in the amount of one copy into the fourth chromosome of the genome of the specially selected clone No. 42. The ZeoR antibiotic resistance genes are absent in the selected clone No. 42. Thus, clone No. 42 can be used in industry as a strain producing the enzyme mannanase. The enzyme was produced and its properties were studied. An enzyme purification procedure was developed to obtain enzyme preparations. Samples of recombinant enzymes were developed. The study of the obtained preparation of β -mannanase showed that the optimum pH of β -mannanase is 2.5–6.0. The resulting enzyme preparation is thermostable, showing high activity up to 80 °C. The temperature optimum is 50 and 70 °C.

Key words: mannanase; *Komagataella phaffii*; heterologous expression; enzyme; producer strain.

Acknowledgements: The study was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as a part of the comprehensive project on high-tech industry "Creation of high-tech production of high-quality plant food proteins" (The agreement on the provision of subsidies from the federal budget for the development of cooperation of a state scientific institution and organization the real sector of the economy in order to implement a comprehensive project for the creation of high-tech industry No. 075-11-2020-036 from 15.12.2020) in the framework of the Decree of the Government of the Russian Federation of April 9, 2010 No. 218 on the basis of the ICG SB RAS. The authors are grateful to the BRC "Collection of Biotechnological Microorganisms as a Source of Novel Promising Objects for Biotechnology and Bioengineering" of the Federal Research Center ICG SB RAS, grant number FWNR-2022-0022.

For citation: Zadorozhny A.V., Pavlova E.Yu., Ushakov V.S., Bogacheva N.V., Shlyakhtun V.N., Rozanov A.S., Voskoboiev M.E., Korzhuk A.V., Novikova D.S., Bannikova S.V., Mescheryakova I.A., Vasileva A.R., Bryanskaya A.V., Bochkov D.V., Shipova A.A., Goryachkovskaya T.N., Peltek S.E. Heterologous expression of the *Thermothielavioides terrestris* mannanase gene in the *Komagataella phaffii* genome. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;8(4):344-351. DOI 10.18699/LettersVJ-2022-8-21 (in Russian)

Введение

Среди гемицеллюлоз наибольший интерес для биотехнологии представляют β -маннаназы – ферменты, относящиеся к классу О-гликозид-гидролаз, и расщепляющие маннаны. Эти полисахариды широко распространены в семенах бобовых растений (Dhawan, Kaur, 2007), являются основными компонентами гемицеллюлозной фракции мягких пород древесины и широко присутствуют в тканях растений. β -маннаназы вырабатываются растениями, животными, актиномицетами, грибами и бактериями. Эти ферменты могут функционировать в условиях широкого диапазона pH и температуры. Так, β -маннаназы нашли применение в различных отраслях промышленности, таких как производство кормов для животных, пищевая промышленность, биопереработка, текстильная промышленность, производство моющих средств, бумаги и целлюлозы.

Данных о получении препаратов β -маннаназы достаточно много. Это высокоактивные β -маннаназы (Wang et al., 2015; Liu et al., 2018), которые в зависимости от источника обладают термоустойчивостью (Kern et al., 2020; Liu et al., 2020a) либо устойчивостью к щелочным (Luo et al., 2012; Zheng et al., 2016) или кислым (Luo et al., 2009) pH.

Природными источниками β -маннаназ являются преимущественно бактерии и грибы. Наибольшее число маннолитиков выявлено среди грамположительных бактерий – представителей рода *Bacillus* (David et al., 2018), но некоторые грамотрицательные бактерии, такие как *Klebsiella oxytoca*, также эффективно деградируют маннан (Tuntrakool, Keawsompong, 2018). Обширная группа маннолитиков среди грибов представлена представителями рода *Aspergillus* (Liu et al., 2020b), β -маннаназы также изолированы из *Trichoderma* sp. и *Penicillium* sp. (Agrawal et al., 2011; Blibech et al., 2011). Показано, что некоторые актиномицеты *Streptomyces* sp. и *Nocardioopsis* sp. также способны эффективно деградировать маннан (Gohel, Singh, 2015; Pradeep et al., 2016).

У большинства грибных β -маннаназ оптимум активности наблюдается при кислых значениях pH, в то время как у бактериальных – при нейтральных pH. β -маннаназы с оптимумом pH 9 и 10 выявлены у некоторых алкалофильных представителей *Bacillus* sp. Оптимальные температуры активности β -маннаназ варьируют от 30 до 90 °C – в зависимости от источника фермента. Бактериальные β -маннаназы характеризуются в массе своей более высокой удельной активностью и термостабильностью по сравнению с грибными β -маннаназами (Chauhan et al., 2012, 2014).

Биотехнологическое использование β -маннаназ зависит от свойств фермента. Так, кислые β -маннаназы совместно с целлюлазами, ксила- и глюканазами могут быть использованы для ферментативной обработки лигноцеллюлозной биомассы, продукты гидролиза которой применяют для биотехнологического производства биотоплива, что увеличивает эффективность утилизации возобновляемых ресурсов. Нейтральные β -маннаназы предпочтительны для биоконверсии β -маннаназ в маннанолигосахариды для здорового питания (пребиотики). Щелочные β -маннаназы применяют в бумажной и текстильной промышленности для отбеливания бумажной пульпы и тканей, а также используют как компонент детергентов в моющих средствах. Термостабильные β -маннаназы, активные в широком диапазоне pH, предпочтительны для получения ферментных препаратов для кормопроизводства.

Коммерческие ферментные препараты, в состав которых входит β -маннаназ, преимущественно получают на основе рекомбинантных штаммов грибов и дрожжей. Большое количество генов β -маннаназ экспрессировано в гетерологичных хозяевах. Гены β -маннаназ из бактериальных источников экспрессировали в *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Brevibacillus brevis*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces cicerisporous*; гены β -маннаназ из грибов экспрессировали в *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*,

Aspergillus sp., *Trichoderma reesei* (Van Zyl et al., 2010; Srivastava, Karoor, 2016). Наиболее перспективным является создание рекомбинантных штаммов продуцентов β-маннаназы на основе метилотрофных дрожжей *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) и дрожжей рода *Ogataea* (*Hansenula*). При использовании несбраживаемых источников углерода (глицерина, метанола и т. п.) метилотрофные дрожжи способны к росту с образованием биомассы высокой плотности, что позволяет получать значительные количества гетерологичного белка (Gellissen, 2000; Ahmad et al., 2014). При этом процесс культивирования метилотрофных дрожжей достаточно прост, поскольку их рост не блокируется продуктами метаболизма (Cereghino, Cregg, 2000; Stockmann et al., 2009).

Целью исследования являлась экспрессия в метилотрофных дрожжах *K. phaffii* гена β-маннаназы из гриба *Thermothielavioides terrestris*, оптимум активности фермента которого находится в кислой области.

Материалы и методы

Штаммы, плазмиды и среды

Сборка конструкций для манипуляции генетическим материалом, метод получения штамма продуцента и технология культивирования описаны в работе А.В. Задорожного и коллег (2022).

Штаммом для экспрессии выбран *K. phaffii* T07. Штамм T07 ранее обнаружен в Симферополе (Российская Федерация), охарактеризован в лаборатории молекулярных биотехнологий ИЦиГ СО РАН и депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (№ Y-4936). Для конструирования плазмид использован штамм *E. coli* XL1-blue (Merck Group, Германия). Ранее разработанная в лаборатории молекулярных биотехнологий плаزمида pPZL применена для конструирования интеграционного вектора и экспрессирующей конструкции. Питательные среды и компоненты – BD Difco (Нидерланды). Эндонуклеазы рестрикции, Taq-полимераза, T4 ДНК-лигаза и щелочная фосфатаза – ООО «СибЭнзим» (Российская Федерация). ДНК-полимераза Q5® High-Fidelity и набор реагентов NEBuilder HiFi – New England Biolabs (США). Праймеры синтезированы ООО «БиоСет» (Российская Федерация).

Конструирование встраиваемого гена

При анализе баз данных, содержащих генетические последовательности микроорганизмов, выбрана последовательность ранее не изученной маннаназы *Thermothielavioides terrestris* NRRL 8126 (XP_003658237.1).

Кодонный состав гена маннаназы *Thermothielavioides terrestris* оптимизирован с использованием алгоритма OPTIMIZER. Для получения последовательностей, адаптированных для экспрессии в *K. phaffii*, удалены сигнальные пептиды, обнаруженные в аминокислотных последовательностях при помощи алгоритма SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Генетические конструкции для встройки в штамм-продуцент синтезированы в Atg:biosynthetics (Германия) (Puigbo et al., 2007).

Для создания первичных конструкций применяли метод сборки Гибсона (Gibson et al., 2009). Амплификация гена маннаназы проведена в плазмиде pPIC9, в то время как ам-

плификация плазмидной части конструкции – в плазмиде pPZL.

Оценка ферментативной активности полученных штаммов

Полученные колонии засеивали в 2 мл среды YPgM (BD Difco, Нидерланды) с 0.3 % глюкозы и 1 % метанола в 24-луночный планшет с глубокими лунками. В каждую ячейку помещали единственную колонию. В качестве отрицательного контроля использовали штамм *K. phaffii* T07 без встроенного гена маннаназы. Клетки инкубировали при 30 °С в термошейкере (480 об/мин). Через каждые 24 ч добавляли по 200 мкл 10 % метанола в каждую ячейку планшета. Через 72 ч отобрали по 500 мкл культуры из каждой ячейки планшета, переносили в 1.5 мл пробирки и осаждали клетки центрифугированием при 4000 г в течение 5 мин.

Активность β-маннаназы определяли по методу Миллера с динитросалициловой кислотой (ДНСК) (Miller, 1959). В качестве субстрата использовали камедь рожкового дерева. Оптическую плотность полученного окрашенного раствора измеряли при 546 нм по отношению к контролю. Анализ ферментов во всех случаях проводили в трех повторностях, результаты являются средними по трем определениям. Калибровка выполнена по маннозе.

Одну единицу ферментативной активности определяли как количество фермента, необходимое для высвобождения одного мкмоль маннозы в минуту в условиях анализа. Ферментативную реакцию проводили при температуре 60 °С и pH 3.0. Концентрацию белка в культуральной жидкости определяли по Брэдфорду с использованием набора Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя (Bradford, 1976). При оценке активности в качестве положительного контроля использовали коммерческий препарат маннаназы, а в качестве отрицательного – супернатант из образца культуры *K. phaffii* T07 без встроенного целевого гена.

Наработка фермента в биореакторе

Отдельную колонию с чашки инокулировали в колбу объемом 500 мл, содержащую 100 мл среды YPD с 2 % глюкозы. Культивировали в шейкере-инкубаторе 24 ± 2 ч при 30 ± 1 °С, 250 ± 10 об/мин. Через 24 ± 2 ч полученную культуру переливали в колбу объемом 1000 мл, содержащую 400 мл свежей среды YNB с 2 % глюкозы, и культивировали в шейкере-инкубаторе еще 24 ± 2 ч при 30 ± 1 °С, 250 ± 10 об/мин.

Ферментацию проводили в биореакторе с рабочим объемом 5 л (Sysbiotech, Франция). Четыре литра питательной среды, содержащей в одном литре: 45 мл глицерина, 9.375 г сульфата аммония, 1.875 г дигидрата сульфата кальция, 0.9375 г хлорида натрия, 3.75 г гептагидрата сульфата магния, 3.75 г дигидроортофосфата калия, 6.25 г сорбита. Среду предварительно стерилизовали при 121 °С в течение 60 мин. 10 мл микроэлементов и 10 мл витаминов стерилизовали фильтрованием и асептически добавляли в ферментер. Рост клеток отслеживали проверяя массу влажных клеток каждые 24 ч. Во время фазы наработки биомассы поддерживали следующие параметры: pH 5.8 ± 0.2, температура 30 ± 1 °С, скорость потока воздуха 3–5 л/мин, скорость

перемешивания 400–1200 об/мин. Растворенный кислород поддерживали на уровне 20–30 % за счет увеличения скорости перемешивания, потока воздуха и добавления чистого кислорода в среду.

Наработку биомассы продолжали до истощения глицерина в среде, о чем свидетельствовал резкий скачок содержания кислорода (до 50–70 %, приблизительно через 18–22 ч с момента начала культивирования). Затем начинали фазу индукции с добавления 40 мл метанола. Как только культура адаптировалась и переходила на новый источник углерода, о чем свидетельствовало снижение кислорода до 20 %, добавляли по 60 мл метанола при наблюдении пика растворенного кислорода, по 5 мл метанола каждые 60 мин, по 5 мл микроэлементов каждые 24 ч. Фазу индукции продолжали 84–96 ч. За час до завершения процесса культивирования охлаждали культуру до 5 °С.

Очистка фермента из дрожжевой культуральной жидкости

Все стадии фильтрации проводили при температуре 6 ± 4 °С на установке тангенциальной фильтрации Sartocoon® Slice с насосом Sartojet (Sartorius Stedim Biotech, Германия). Культуральную жидкость отделяли с использованием кассет для микрофильтрации с размером пор 0.45 мкм («Владисарт», Россия). Клетки отмывали один раз 1 об/об холодной воды (5 ± 2 °С). Воду добавляли, когда объем концентрата клеток уменьшался вдвое. Полученную культуральную жидкость очищали от высокомолекулярных соединений при помощи кассет для ультрафильтрации с размером пор 300 кДа («Владисарт», Россия). Концентрат 300 кДа отмывали один раз 1 об/об холодной воды (5 ± 2 °С). Фильтрат 300 кДа концентрировали на каскетах с размером пор 10 кДа (Sartorius Stedim Biotech, Германия). Концентрат 10 кДа отмывали четыре раза 3 об/об холодной воды (5 ± 2 °С). Воду добавляли, когда объем концентрата уменьшался до минимума (375 ± 50 мл). Полученный концентрат немедленно перенесли в плоские поддоны с высотой стенок 3 см, заполняя их на 1/3 высоты стенок, и помещали в подготовленную лиофильную сушку.

Определение температурного и pH-оптимума фермента

Раствор фермента очищали от примесей охлажденной до 2 °С деионизованной водой, используя центрифужные концентраторы Vivaspin (Sartorius Stedim Biotech, Германия) с размером пор мембраны 10 кДа. Полученный концентрат фермента в воде разбавляли соответствующим выбором 50 мМ трис-глициновым буфером таким образом, что концентрация белка в растворе составила 0.06 мг/мл. Исследуемые и контрольные пробы инкубировали при необходимой температуре в течение 20 мин, а затем останавливали добавлением 300 мкл 1 % раствора ДНСК. Полученный раствор инкубировали на водяной бане при 98 °С в течение 10 мин. Оптическую плотность продуктов реакции гидролиза определяли при $\lambda = 546$ нм.

Активность β -маннаназы определяли по методу Миллера с ДНСК (Miller, 1959). В качестве субстрата использовали камедь рожкового дерева. Для задания нужных значений pH использовали 50 мМ ацетатный буфер (pH 4.0–6.3) и водные

системы на основе уксусной кислоты (pH 2.5–3.5). Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976). Исследуемые и контрольные пробы инкубировали при 55 °С в течение 20 мин, затем реакцию останавливали добавлением 1 мл 1.2 М ДНСК. Полученный раствор инкубировали в течение 10 мин на водяной бане при 98 °С. Оптическую плотность продуктов реакции гидролиза определяли при $\lambda = 546$ нм.

После определения pH-оптимума выявляли температурный оптимум маннаназы. Раствор маннозы в оптимальном буферном растворе прогревали при соответствующей выборке температуре и добавляли в прогретый раствор субстрата необходимое количества раствора фермента в концентрации 0.06 мг/мл в том же буфере. Исследуемые и контрольные пробы инкубировали при необходимой температуре в течение 20 мин, затем останавливали реакцию добавлением 300 мкл 1 % раствора ДНСК. Полученный раствор инкубировали на водяной бане при 98 °С в течение 10 мин. Оптическую плотность продуктов реакции гидролиза определяли при $\lambda = 546$ нм.

Определение степени ингибирования фермента ионами металлов

Для определения влияния ионов металлов на гидролитическую активность фермента 0.4 мл 2 % раствора субстрата в 25 мМ Трис-НСI буфере (pH 3.5), содержащего 2 и 2.5 мкМ соответствующей соли, нагревали до 60 °С и добавляли к нему 0.2 мл раствора фермента в том же буфере с концентрациями соли 3 или 15 мМ, при этом концентрация белка в реакционной смеси составляла 0.02 мг/мл. Реакционную смесь инкубировали при 60 °С в течение 20 мин, затем останавливали ферментативную реакцию добавлением 300 мкл 1 % раствора ДНСК. Контрольные пробы субстрата без фермента, содержащего необходимую концентрацию соответствующей соли, прогревали при той же температуре. Спустя 20 мин в контрольные образцы добавляли 1 мл 1.2 М ДНСК и 0.2 мл раствора фермента, содержащего ионы металлов. Полученный раствор инкубировали на водяной бане при 98 °С в течение 10 мин. Оптическую плотность продуктов реакции гидролиза определяли при $\lambda = 546$ нм.

Электрофоретический анализ

Для проведения электрофоретического анализа препарата маннаназы T07 1x-A Vman-TrTe клон 42 образцы культуральной жидкости смешивали в соотношении 1:1 с буфером для нанесения (0.05 М Трис-НСI pH 6.8, 2 % ДСН, 0.002 % бромфеноловый синий, 10 % глицерин, 5 % меркаптоэтанол), затем кипятили в течение 5 мин. Белки концентрировали в 4 % ПААГ-ДСН (акриламид/бисакриламид в соотношении 37.5:1, 0.1 % ДСН, 0.125 мМ Трис-НСI pH 6.8, 0.1 % ТЕМЕД, 0.05 % ПСА) при силе тока 10 мА на гель и разделяли в 12 % ПААГ-ДСН (акриламид/бисакриламид в соотношении 37.5:1, 0.1 % ДСН, 0.375 мМ Трис-НСI pH 8.8, 0.05 % ТЕМЕД, 0.05 % ПСА) при силе тока 10 мА на гель в электрофоретической камере Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, США). Гели окрашивали SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Invitrogen, США) и фотографировали при помощи гель-документирующей системы VersaDoc MP4000 (Bio-Rad, США).

Результаты и обсуждение

Получение генетической конструкции для экспрессии в *K. phaffii* T07

Komagataella phaffii широко используют как в качестве модельного организма (Bernauer et al., 2021), так и продуцента биополимеров (Ata et al., 2021). Плазмида содержит оптимизированный ген маннаназы *Thermothielavioides terrestris*, слитый с сигнальным пептидом альфа-фактора *S. cerevisiae*, под контролем промотора и терминатора гена *AOX1* для индуктивной экспрессии в дрожжах *K. phaffii*, а также ориджин репликации плазмиды, ген устойчивости к зеоцину для экспрессии в *E. coli*.

По результатам рестрикционного анализа клон плазмиды BMAN_TrTe № 13 содержал фрагменты, соответствующие расчетам. Для выбора клона, несущего целевую генетическую конструкцию, проведен рестрикционный анализ с помощью эндонуклеаз рестрикции *Bgl* II и *Vam*H I. Результаты рестрикционного анализа оценены с помощью гелеэлектрофореза (рис. 1).

Последовательности генов данных плазмид и правильность сборки подтверждены секвенированием. Полученные плазмиды клонированы в штамм *K. phaffii* T07 при помощи электропорации. Выросшие колонии анализировали на способность вырабатывать и выделять в культуральную жидкость активную β -маннаназу. Полученные трансфор-

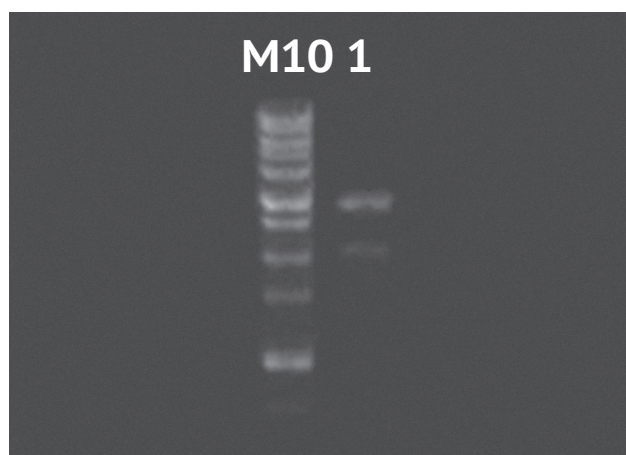


Рис. 1. Фотография гелеэлектрофореза с результатами рестрикционного анализа плазмид с генами маннаназ TrTe M10 – маркер молекулярного веса Sky-High S-8000 «Биолабмикс» (от 250 до 10,000 п.н.); 1 – клон плазмиды BMAN_TrTe № 13

манты *K. phaffii* использованы для наработки целевого белка маннаназы *Thermothielavioides terrestris* в биореакторах. Препарат маннаназы получали методом тангенциальной ультрафильтрации с применением системы фильтров Vivaspin (Sartorius Stedim Biotech, Германия).

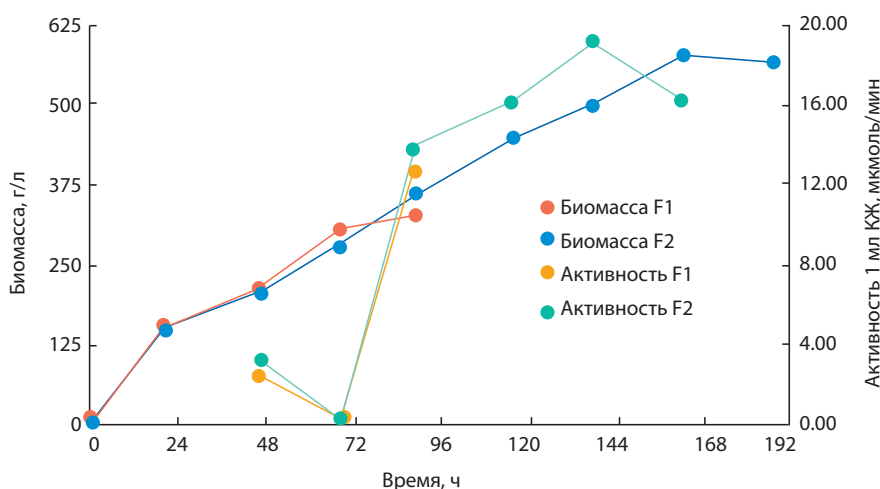


Рис. 2. Динамика активности фермента маннаназы в культуральной жидкости (КЖ) в биореакторах

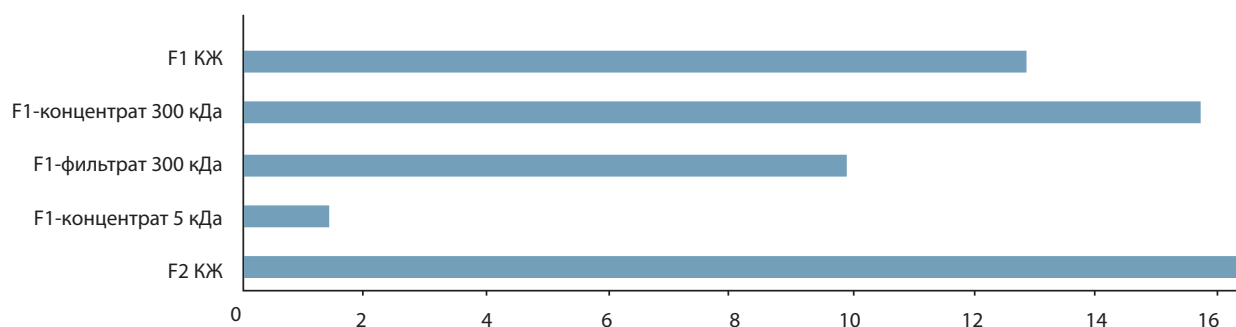


Рис. 3. Активность маннаназы во фракциях после тангенциальной фильтрации, F1 и F2 (КЖ – культуральная жидкость)

Оптимизация параметров наработки в биореакторе

Известно, что биомасса *K. phaffii* может составлять более 100 г/л при использовании в качестве субстрата метанола, а также других простых соединений, таких как глюкоза или глицерин (Heistingner et al., 2020). К индукции приступали после того, как помещенные в биореактор трансформанты достигли содержания 90 г клеточной массы на 1 л сырой массы, а также значительно повысился уровень растворенного кислорода, сигнализирующий об уменьшении концентрации глицерина в среде (Guangbo et al., 2021). Для этого в ферментер добавляли 10 мл микроэлементов и 10 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. В качестве индуктора промотора AOX1 использовали 60 % раствор метанола. Начинали стадию индукции с добавления 30 мл индуктора и снижения температуры до 25 °С. При достижении адаптации к метанолу и уровня кислорода ниже 20 % запускали периодическую подачу метанола в реакционную колбу в первые 3 ч после индукции каждые 20 мин по 4 мл, затем по 6.7 мл индуктора до конца культивирования. При резком росте растворенного кислорода выше 23 % добавляли 40 мл индуктора. Культивирование проводили в течение 3 сут после начала индукции. При достижении содержания биомассы 145 г/л снижали температуру до 20 °С. Рост культуры наблюдали на протяжении всего процесса ферментации, при этом максимальное содержание биомассы составило более 500 г/л (рис. 2). Важно отметить, что для секретируемых продуктов биосинтеза содержание клеток-продуцентов в среде практически пропорционально количеству секретируемого белка (Duman-Özdamar, Binay, 2021).

Запущены два биореактора с клоном *Pichia pastoris*, несущим ген маннаназы *Tribulus terrestris*: T07-1x A-Bman-TrTe клон 42. Как видно из рис. 2, активность целевого фермента продолжала нарастать при дальнейшем культивировании штамма-продуцента и на 115-м часу была выше, чем на 68-м, в 1.5 раза (156 %). На 89-м часу культивирования снят реактор F1, отделена культуральная жидкость и проведено фракционирование при помощи системы тангенциальной фильтрации.

Результаты анализа активности маннаназы в полученных фракциях приведены на рис. 3. Показано, что увеличение времени культивирования штамма в два раза позволяет повысить активность маннаназы в культуральной жидкости в полтора раза. Основная активность оставалась в концентрате после фильтра 300 кДа.

Активность и параметры работы фермента

Оптimum pH определяли при температуре 60 °С в аналогичных условиях, за исключением pH. Для задания нужных значений pH использовали ацетатный буфер (pH 4.0–6.3) и водные системы на основе уксусной кислоты (pH 2.5–3.5) (рис. 4, а). Таким образом, ферментный препарат маннаназы сохраняет более 80 % активности в диапазоне pH от 2.5 до 5.5. Температурный optimum составил 50–60 °С с самой высокой активностью при температуре 60 °С (см. рис. 4, б).

Продемонстрировано, что в основном ионы металлов в высокой концентрации в разной степени снижают активность рекомбинантной маннаназы (рис. 5). Активность фермента возрастает в присутствии солей кобальта, марганца и

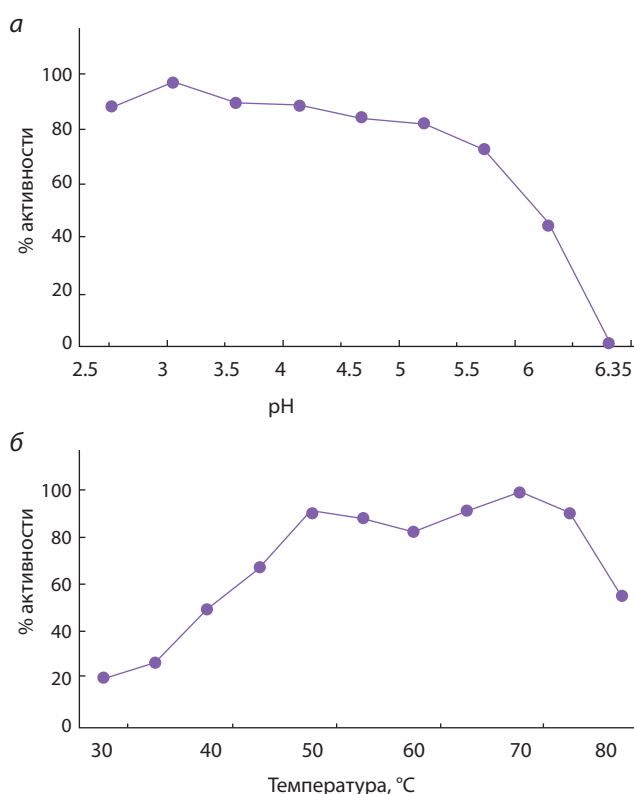


Рис. 4. Зависимость ферментативной активности маннаназы TrTe от pH среды (а) и температуры реакционной смеси (б)

магния. Соли железа, меди и свинца ингибируют активность фермента.

Электрофоретический анализ

Расчетный молекулярный вес фермента составил 44.8 кДа, что не вполне соответствует фактической массе белка согласно электрофоретической подвижности (рис. 6). Дополнительный анализ электрофоретических данных проведен с применением пакета программ Quantity One (Bio-Rad, США). Сравнение плотности белковых фракций контрольного штамма и клона № 42 показало, что содержание дополнительных фракций в препарате культуральной жидкости клона № 42 составило 52.65 %. Следует отметить, что дополнительные электрофоретические фракции в препарате КЖ клона № 42 строго связаны с наличием маннаназной активности.

Заключение

Выполнены клонирование и анализ свойств ранее не исследованного белка β -маннаназы из *Thermothielavioides terrestris*. Ген обнаружен в базе NCBI. Синтезирован ген с кодонной последовательностью, адаптированной для экспрессии в дрожжах *K. phaffii*. Получена плазмида pPZL-1x-A-BMAN_TrTe, несущая одну копию конструкции, экспрессирующей ген маннаназы из *Thermothielavioides terrestris*. Плазмида клонирована в штамм дрожжей *K. phaffii* T07 под контролем промотора и терминатора гена AOX1. В результате получен штамм *K. phaffii* T07-BMAN_TrTe, в геноме которого есть последовательность, кодирующая ген фермента

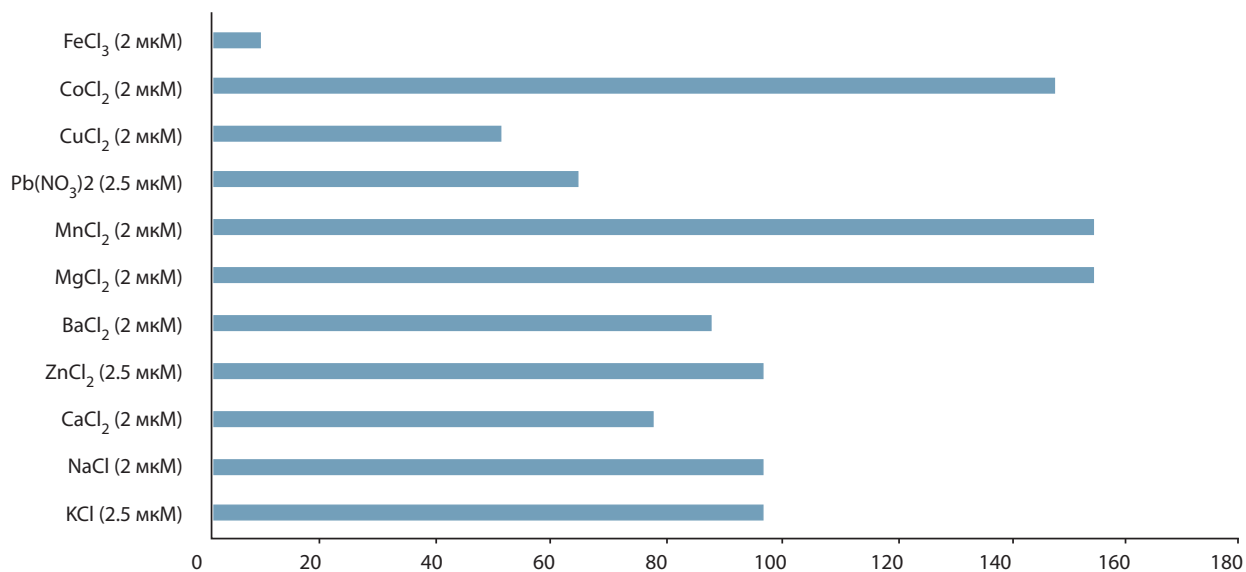


Рис. 5. Уровни ферментативной активности в присутствии солей различных металлов, %

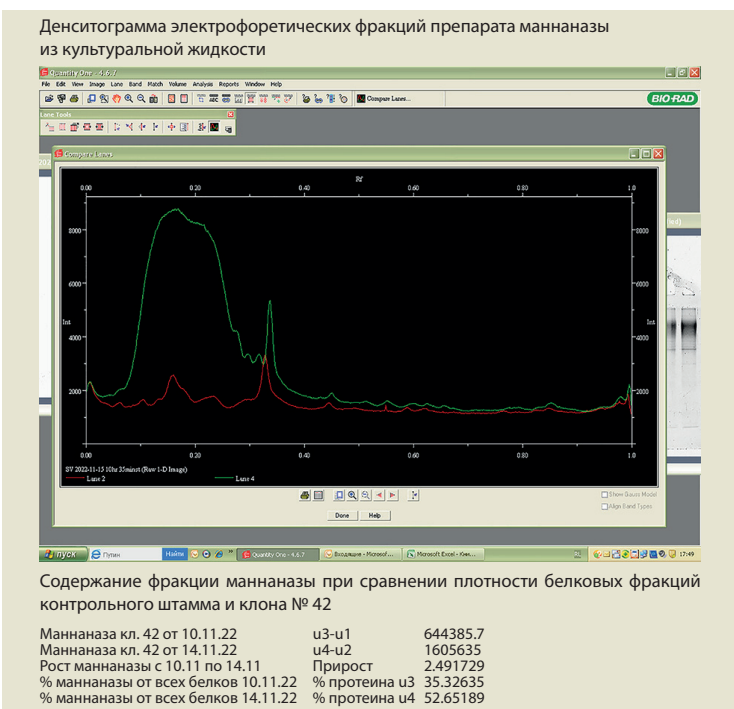
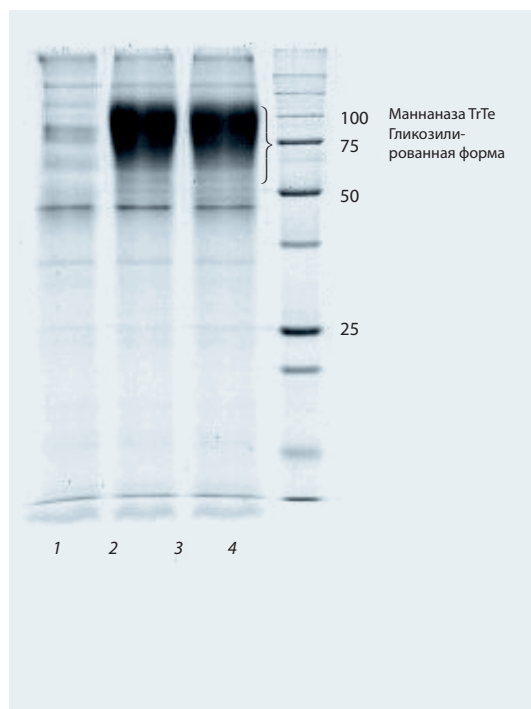


Рис. 6. Электрофореграмма препарата манназазы TtTe из культуральной жидкости клона 42 T07 1x-A Vman-TtTe, осветленной центрифугированием. Маркер молекулярного веса Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad, США)

1 – исходный штамм T07; 2 – T07 1x-A Vman-TtTe клон 42 ферментер F1; 3 – T07 1x-A Vman-TtTe клон 42 ферментер F2; 4 – стандарт молекулярного веса 10–250.

Соотношение образца к буферу – 1:1 (нанесение: 1, 2, 3 – 10 мкл, 4 – 3 мкл) 12 % SDS PAGE, Sypro Ruby Protein Stain

манназазы, и отсутствует ген устойчивости к антибиотику ZeoR. Таким образом, клон № 42 может быть применен в промышленности в качестве штамма-производителя.

Согласно результатам геле-электрофореза, в составе белков культуральной жидкости наблюдается несколько характерных фракций примерно от 70 до 110 кДа, формирование которых свидетельствует о гликозилировании белка при экспрессии в *K. phaffii*. Содержание дополнительных

фракций в препарате культуральной жидкости клона 42 составляет 52.65 %. Анализ свойств фермента показал, что оптимум его активности наблюдался при 50 и 70 °C и pH 3. Фермент сохраняет высокую активность при pH 2.5–6.0 и температуре 30–80 °C. Установлено, что активность фермента возрастает в присутствии солей Co, Mg и Mn. Практически полностью подавляет активность фермента ион Fe³⁺.

Список литературы / References

- Agrawal P, Verma D, Daniell H. Expression of *Trichoderma reesei* β -mannanase in tobacco chloroplasts and its utilization in lignocellulosic woody biomass hydrolysis. *PLoS One*. 2011;6(12):e29302. DOI 10.1371/journal.pone.0029302.
- 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(12):5301-5317. DOI 10.1007/s00253-014-5732-5.
- Ata Ö., Ergün B.G., Fickers P., Heisteringer L., Mattanovich D., Rebnegger C., Gasser B. What makes *Komagataella phaffii* non-conventional? *FEMS Yeast Res.* 2021;21(8):foab059. DOI 10.1093/femsyr/foab059.
- Bernauer L., Radkohl A., Lehmayr L.G.K., Emmerstorfer-Augustin A. *Komagataella phaffii* as emerging model organism in fundamental research. *Front. Microbiol.* 2021;11:607028. DOI 10.3389/fmicb.2020.607028.
- Blibech M., Ellouz Ghorbel R., Chaari F., Dammak I., Bhiri F., Neifar M., Ellouz Chaabouni S. Improved mannanase production from *Penicillium occitanis* by fed-batch fermentation using acacia seeds. *ISRN Microbiol.* 2011;2011:938347. DOI 10.5402/2011/938347.
- 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(1-2):248-254. DOI 10.1006/abio.1976.9999.
- Cereghino J.L., Cregg J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 2000;24(1):45-66. DOI 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x.
- Chauhan P.S., George N., Sondhi S., Puri N., Gupta N. An overview of purification strategies for microbial mannanases. *Int. J. Pharm. Bio Sci.* 2014;5(1):176-192.
- Chauhan P.S., Puri N., Sharma P., Gupta N. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012;93(5):1817-1830. DOI 10.1007/s00253-012-3887-5.
- David A., Singh Chauhan P., Kumar A., Angural S., Kumar D., Puri N., Gupta N. Coproduction of protease and mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11 in solid state fermentation and their combined application as detergent additives. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018;108:1176-1184. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.037.
- Dhawan S., Kaur J. Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2007;27(4):197-216. DOI 10.1080/07388550701775919.
- Duman-Özdamar Z.E., Binay B. Production of industrial enzymes via *Pichia pastoris* as a cell factory in bioreactor: Current status and future aspects. *Protein J.* 2021;40(3):367-376. DOI 10.1007/s10930-021-09968-7.
- Gellissen G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000;54(6):741-750. DOI 10.1007/s002530000464.
- Gibson D.G., Young L., Chuang R.Y., Venter J.C., Hutchison C.A., Smith H.O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods.* 2009;6(5):343-345. DOI 10.1038/nmeth.1318.
- Gohel S., Singh S. Thermodynamics of a Ca²⁺-dependent highly thermostable alkaline protease from a haloalkaliphilic actinomycete. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015;72:421-429. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2014.08.008.
- Guangbo Y., Min S., Wei S., Lixin M., Chao Z., Yaping W., Zunxi H. Heterologous expression of nattokinase from *B. subtilis* natto using *Pichia pastoris* GS115 and assessment of its thrombolytic activity. *BMC Biotechnol.* 2021;21(1):49. DOI 10.1186/s12896-021-00708-4.
- Heisteringer L., Gasser B., Mattanovich D. Microbe Profile: *Komagataella phaffii*: a methanol devouring biotech yeast formerly known as *Pichia pastoris*. *Microbiology.* 2020;166(7):614-616. DOI 10.1099/mic.0.000958.
- Kern A., Shanahan D., Buesen R., Geiger D. Safety evaluation of a β -mannanase enzyme preparation produced with *Thermothelomyces thermophilus* expressing a protein-engineered β -mannanase gene. *PLoS One.* 2020;15(12):e0243647. DOI 10.1371/journal.pone.0243647.
- Liu J., Basit A., Miao T., Zheng F., Yu H., Wang Y., Jiang W., Cao Y. Secretory expression of beta-mannanase in *Saccharomyces cerevisiae* and its high efficiency for hydrolysis of mannans to mannoooligosaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018;102(23):10027-10041. DOI 10.1007/s00253-018-9355-0.
- Liu Z., Ning C., Yuan M., Fu X., Yang S., Wei X., Xiao M., Mou H., Zhu C. High-efficiency expression of a superior β -mannanase engineered by cooperative substitution method in *Pichia pastoris* and its application in preparation of prebiotic mannoooligosaccharides. *Bioresour. Technol.* 2020a;311:123482. DOI 10.1016/j.biortech.2020.123482.
- Liu Z., Ning C., Yuan M., Yang S., Wei X., Xiao M., Fu X., Zhu C., Mou H. High-level expression of a thermophilic and acidophilic β -mannanase from *Aspergillus kawachii* IFO 4308 with significant potential in mannoooligosaccharide preparation. *Bioresour. Technol.* 2020b;295:122257. DOI 10.1016/j.biortech.2019.122257.
- Luo H., Wang K., Huang H., Shi P., Yang P., Yao B. Gene cloning, expression, and biochemical characterization of an alkali-tolerant β -mannanase from *Humicola insolens* Y1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2012;39(4):547-555. DOI 10.1007/s10295-011-1067-8.
- Luo H., Wang Y., Wang H., Yang J., Yang Y., Huang H., Yang P., Bai Y., Shi P., Fan Y., Yao B. A novel highly acidic beta-mannanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1: gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009;82(3):453-461. DOI 10.1007/s00253-008-1766-x.
- Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 1959;31(3):426-428. DOI 10.1021/ac60147a030.
- Pradeep G.C., Cho S.S., Choi Y.H., Choi Y.S., Jee J.P., Seong C.N., Yoo J.C. An extremely alkaline mannanase from *Streptomyces* sp. CS428 hydrolyzes galactomannan producing series of mannoooligosaccharides. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2016;32(5):84. DOI 10.1007/s11274-016-2040-5.
- Puigbo P., Guzman E., Romeu A., Garcia-Vallve S. OPTIMIZER: A web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:W126-W131. DOI 10.1093/nar/gkm219.
- Srivastava P.K., Kapoor M. Production, properties, and applications of endo- β -mannanases. *Biotechnol. Adv.* 2017;35(1):1-19. DOI 10.1016/j.biotechadv.2016.11.001.
- Stockmann C., Scheidle M., Dittrich B., Merkelbach A., Hehmann G., Melmer G., Klee D., Buchs J., Kang H.A., Gellissen G. Process development in *Hansenula polymorpha* and *Arxula adenivorans*, a re-assessment. *Microb. Cell Fact.* 2009;8:22. DOI 10.1186/1475-2859-8-22.
- Tuntrakool P., Keawsompong S. Kinetic properties analysis of beta-mannanase from *Klebsiella oxytoca* KUB-CW2-3 expressed in *Escherichia coli*. *Protein. Exp. Purif.* 2018;146:23-26. DOI 10.1016/j.pep.2018.01.009.
- Van Zyl W.H., Rose S.H., Trollope K., Gorgens J.F. Fungal β -mannanases: mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Process Biochem.* 2010;45(8):1203-1213. DOI 10.1016/j.procbio.2010.05.011.
- Wang C., Luo H., Niu C., Shi P., Huang H., Meng K., Bai Y., Wang K., Hua H., Yao B. Biochemical characterization of a thermophilic β -mannanase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 with high specific activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015;99(3):1217-1228. DOI 10.1007/s00253-014-5979-x.
- Zadorozhny A.V., Ushakov V.S., Rozanov A.S., Bogacheva N.V., Shlyakhtun V.N., Voskoboev M.E., Korzhuk A.V., Romancev V.A., Bannikova S.V., Mescheryakova I.A., Antonov E.V., Vasilieva A.R., Pavlova E.I., Chesnokov D.O., Shedko E.D., Bryanskaya A.V., Bochkov D.V., Goryachkovskaya T.N., Peltek S.E. Heterologous expression of xylanase xAor from *Aspergillus oryzae* in *Komagataella phaffii* T07. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(15):8741. DOI 10.3390/ijms23158741.
- Zheng H., Yu Z., Fu X., Li S., Xu J., Song H., Ma Y. High level extracellular production of a truncated alkaline beta-mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Escherichia coli* by the optimization of induction condition and fed-batch fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2016;43(7):977-987. DOI 10.1007/s10295-016-1773-3.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.11.2022. После доработки 28.11.2022. Принята к публикации 02.12.2022.