

УДК 577.2; 604.4; 577.15

ТЕРМОСТАБИЛЬНАЯ РЕКОМБИНАНТНАЯ ФИТАЗА, ПРОИЗВЕДЁННАЯ В *E. COLI*

Е.Б. Евтыхова, Д.В. Силаев, А.Ж. Балтабекова, А.В. Шустов

РГП «Национальный центр биотехнологии», ул. Валиханова, 13/1, г. Астана, 010000, Казахстан

lenayev26@gmail.com

Постоянно растущий рост населения и рост требований к качеству питания населения в глобальном масштабе требуют увеличения поголовья сельскохозяйственных животных. В условиях ограниченности кормовых ресурсов для животных дальнейшее развитие животноводства требует увеличения эффективности кормов. С 80-х гг. в развитых странах, и в последнее время в развивающихся странах, распространилась и доказала экономическую эффективность технология увеличения питательной ценности кормов путём высвобождения фосфата из фитатов. Фитаты – соли фитиновой кислоты, являются запасной формой фосфора у растений. Указанная технология предусматривает добавление к кормам фитазы. Фитазы – ферменты, расщепляющие фитаты. Добавление фитазы в корма животных позволяет значительно снизить потребление минеральных фосфатов. В статье описано получение фитазы, обладающей высокой термостабильностью, что является промышленно-ценным свойством для кормовой добавки. Проведён синтез гена фитазы *de novo* (из химических предшественников). Фитаза Nov9x является неприродным белком, полученным методами генетической инженерии в результате экспериментов по улучшению технологических свойств природной фитазы AppA *E.coli*. Последовательность Nov9x отличается от последовательности AppA наличием восьми мутаций, каждая из которых увеличивает термостабильность фермента. Синтезированный ген фитазы Nov9x кодон-оптимизирован для экспрессии в *E. coli*. В данной статье описано создание двух генно-инженерных конструкций для бактериальной экспрессии фитазы Nov9x: pET22/Nov9x и pET32/Nov9x. Мы получили фитазу Nov9x в растворимой и ферментативно-активной форме, в виде белка слияния с тиоредоксином *E. coli*. Присутствие тиоредоксина на N-конце белка слияния не оказывало негативного влияния на ферментативную активность и при этом существенно увеличивало экспрессию рекомбинантного белка. Общий выход белка после очистки из 200 мл индуцированной культуры составил 2,1 мг. Удельная активность рекомбинантной фитазы составила 3344 FTU/мг.

Ключевые слова: фитаза, Nov9x, фермент, кормовая добавка, плаزمид, экспрессирующая конструкция, штамм *E. coli*, синтез гена.

THERMOSTABLE RECOMBINANT PHYTASE PRODUCED IN *E. COLI*

Y.B. Yevtykhova, D.V. Silaev, A.J. Baltabekova, A.V. Shustov

National Center for Biotechnology, 13/1 Valikhanov str., Astana, 010000, Kazakhstan

lenayev26@gmail.com

One of the main challenges for the Kazakhstan's livestock and fodder industry is improvement of food supply and increase in feed efficiency. A cost effective way to improve the quality of animal feed is to mobilize bound phosphate from indigestible plant components. Particular feed additives, namely phytases are able to solve this problem. Phytases are enzymes that break down the phytic acid, which is main storage form of phosphorus in plants. This paper describes a method of producing a recombinant thermostable phytase.

Phytase Nov9x is a derivative of *E.coli* phytase AppA with improved thermostability which is an important industrial quality. Compared to the parental phytase AppA, the Nov9x sequence has eight mutations.

Synthetic gene for recombinant thermostable phytase Nov9x was designed *in silico* and synthesized *de novo* from an array of long oligonucleotides. The assembled gene was sequence-verified. Expression constructs were obtained based on the Novagen vectors for bacterial expression, pET22 and pET32. An *E.coli* strain BL21(DE3) transformed with the pET22/Nov9x plasmid did not produced significant amounts of the recombinant protein. Efficient expression of the recombinant protein was observed for same strain transformed with the pET32/Nov9x plasmid. In the latter case the expression product is a fusion protein bearing a sequence of *E.coli* thioredoxin on the

N-terminus and a sequence of phytase (Nov9x) at the C-terminus. Recombinant phytase was purified by metal chelate chromatography. The yield of purified recombinant phytase was 2,1 milligram from 200 ml of induced culture. Specific enzymatic activity of the purified phytase was 3344 FTU per 1 mg of protein.

Biochemical investigations with the recombinant phytase included determination of the pH- and temperature-dependence of activity and description of thermostability.

Obtained phytase demonstrated highest activity in a pH range of 4,5-6,0. Particularly, the recombinant phytase retains at least 20% from maximum activity at pH 1,5 corresponding to most acidic parts of the stomach. The recombinant phytase has high thermal stability: it retains 75% of activity after incubation at 60°C for 2 hours, or 29% of activity after incubation at 70°C for 30 min. Addition of protectant to the probes further improves the thermostability of phytase: in presence of 1 mg/ml gelatine the recombinant phytase retains 50% of activity after incubation at 70°C for 2 hours.

The described gene of thermostable phytase, bacterial strain transformed with expression plasmid and the recombinant enzyme, all have prospects of utilization in production of additives for the livestock and poultry fodder.

Keywords: phytase, Nov9x, enzyme, feed additive, plasmid, gene design, strain *E.coli*, gene synthesis.

ВВЕДЕНИЕ

Для сельского хозяйства Казахстана важно расширение кормовой базы и увеличение эффективности кормов. Важной характеристикой кормов является содержание биодоступного фосфора. Традиционным источником фосфора в кормах являются минеральные фосфаты. Новым и экономически эффективным способом повышения качества кормов является мобилизация фосфата из соединений, которые в большом количестве присутствуют в растительной биомассе, но не усваиваются многими видами сельскохозяйственных животных. Для мобилизации фосфора в биодоступной форме в корма животных на основе растительного сырья добавляют ферментные добавки, содержащие фитазу. В Казахстане производства кормовой фитазы нет. В данной статье описывается получение фитазы, которая обладает высокой активностью при физиологических температурах и сохраняет активность после инкубации при высоких температурах. Термостабильность является необходимым свойством для фермента, который должен выдерживать технологию приготовления кормов. У растений преобладающей формой накопления запасов фосфора являются фитиновая кислота и её соли - фитаты. Фитиновая кислота (мио-инозитолгексакисфосфат или IP6) - это сложный эфир циклического спирта мио-инозитола и ортофосфорной кислоты. Смешанная кальциево-магниевая соль фитиновой кислоты имеет собственное название фитин. У злаков и бобовых 50-80% от общего содержания фосфора приходится на фитин [1]. Проблема недостаточного усвоения фосфора из растительных кормов имеет своей причиной то, что животные с простым однокамерным желудком (свиньи, птицы, рыбы) не способны расщеплять фитин из-за низкой концентрации фитаз в пищеварительном тракте этих животных [2]. Сравнительно новым и экономически эффективным способом решения проблемы дефицита биодоступного фосфора является добавление в корма промышленно произведённых фитаз [3].

Фитазы – группа фосфогидролаз, расщепляющих сложноэфирные связи в молекуле фитиновой кислоты. Субстратом фитаз являются мио-инозитолгексакисфосфат (IP6) и эфиры мио-инозитола с меньшей степенью замещения (IP1-IP5). Полный гидролиз одной молекулы IP6 высвобождает шесть фосфат-ионов [4]. Фитазы обнаружены у более чем 200 видов микроорганизмов и растений, но у позвоночных животных эндогенных фитаз нет [5]. Классификация фитаз IUPAC-IUB основана на преимущественной субстратной специфичности. Фитазы, гидролизующие преимущественно сложноэфирную связь в 6-ом положении, называются 6-фитазами, а фитазы, преимущественно расщепляющие связь в 3-ем положении, называются 3-фитазами. В качестве кормовых добавок используются 6-фитазы (например, фитазы гриба *Peniophora lycii* или *E.coli*) и 3-фитазы (из *Aspergillus niger*) [6]. По типу активного центра фермента выделяют четыре класса фитаз: кислые гистидиновые фосфатазы (*histidine acid phosphatase*, HAP), цистеиновые фитазы (*cysteine*

phytase, CPhy), пурпурные кислые фосфатазы (*purple acid phosphatase*, PAP) и бета-пропеллерные фитазы (*beta-propeller phytase*, BPP) [7]. В зависимости от оптимальной для ферментативной активности кислотности среды фитазы разделяют на два класса: кислые и щелочные фитазы [8]. Кислые фитазы демонстрируют наибольшую активность при pH 2,5-5,5. В аминокислотных последовательностях кислых гистидиновых фитаз имеется консервативный мотив, содержащий остаток гистидина, который участвует в нуклеофильной атаке на отщепляемую фосфатную группу. В группе кислых фитаз выделяются бактериальные и грибные ферменты. Бактериальные кислые фитазы демонстрируют более высокую удельную активность по сравнению с грибными. По литературным данным, из всех изученных к настоящему времени природных фитаз самую высокую удельную активность демонстрируют фитазы *E. coli* и *Citrobacter freundii* (продукты гена *AppA*). Большинство известных бактериальных кислых фитаз способны последовательно отщеплять от молекулы фитиновой кислоты до пяти фосфатных остатков, оставляя в качестве конечного продукта мио-инозитолмонофосфат [9]. Недостатком природных бактериальных фитаз является их низкая термостабильность. С производственной точки зрения важно, что грибные фитазы более термостабильны. Термостабильность бактериальных ферментов может быть существенно улучшена генно-инженерными модификациями. Щелочные фитазы демонстрируют максимум активности при pH 6-9. Глубина гидролиза фитатов для щелочных фитаз обычно ниже, чем для кислых фитаз, но зато щелочные фитазы обладают промышленно-ценной особенностью: они термостабильны, некоторые выдерживают нагрев до 80-95°C. Термостабильность является ценным качеством для ферментов, используемых в качестве кормовых добавок. При промышленном производстве кормов, в ходе гранулирования корма подвергают обработке высокими температурами (~10 мин при +60...85°C в зависимости от вида корма), что необходимо для уничтожения патогенной микрофлоры. Технологически удобно добавлять фитазу в комбикорм до этапа термической обработки готового продукта. Идея использования кормовых фитаз предусматривает, что экзогенная фитаза должна работать в желудке животного. По этой причине способность выдерживать без потери активности термообработку у кормовых ферментов должна сочетаться с сохранением оптимума активности при температурах и значениях pH, обычных для желудка позвоночных (37°C, pH 1-4,5).

Целью данной работы являются получение штамма-продуцента термостабильной рекомбинантной фитазы и исследование термостабильности полученного фермента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генно-инженерные работы

В работе использовали штаммы *E. coli* XLBlue и BL21(DE3). Фрагмент ДНК, несущий полноразмерный ген фитазы *Nov9x*, был синтезирован *de novo* в результате двухраундовой конструктивной ПЦР. Расчёты последовательностей олигонуклеотидов выполнены с использованием программы Oligo 7.4. Олигонуклеотиды для синтеза гена выбирали так, чтобы T_m праймеров для I раунда конструктивной ПЦР составляла 60°C. Для проведения ПЦР использовали высокоточную термофильную полимеразу Phusion HotStart DNA polymerase. Реакционная смесь содержала 50 мМ трис-гидроксиметиламинметана pH 8,3, 50 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl₂ и смесь праймеров с концентрацией 0,2 пМ/мкл каждого праймера, а также 1 е.а. полимеразы Phusion HotStart DNA Polymerase. Программа термоциклирования: 95°C - 1 мин, 55°C - 1 мин, 72°C - 1 мин, 30 циклов. Полученный в ходе ПЦР фрагмент ДНК, несущий полноразмерный ген фитазы *Nov9x*, обрабатывали ДНК-полимеразой Taq для того, чтобы добавить на 3'-концы цепей ДНК по одному неспаренному адениновому основанию. Подготовленный фрагмент клонировали в вектор pGEM-T с использованием набора pGEM-T Easy Vector System

(Promega). После отбора трансформантов выделяли плазмидную ДНК, несущую вставки ожидаемого размера (длина клонированного фрагмента 1294 пн). Соответствие нуклеотидных последовательностей клонированных вставок расчетной первичной структуре подтверждали секвенированием с использованием наборов BigDye 3.1 и автоматического секвенатора ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, США). Для секвенса протяжённой последовательности гена фитазы (>1200 пн) использовали дополнительный набор небольших праймеров, рассчитанных с использованием программы Oligo 7.4.

Продукция рекомбинантной фитазы в бактериях

Ген фитазы Nov9x был вырезан из плазмиды pGEM-T/Nov9x по сайтам NcoI-XhoI и клонирован по указанным сайтам в вектора для бактериальной экспрессии pET22 и pET32a (Novagen). Конструкция pET22/Nov9x кодирует продукт экспрессии длиной 447 ао, с ожидаемой молекулярной массой 48,5 кДа, который соответствовал структуре N6His-Nov9x. При встройке по сайтам NcoI-XhoI в плазмиду pET32a продукт экспрессии представлял собой слитный белок, который на N-конце нес последовательность тиоредоксина *E. coli* (Trx). Рекомбинантный белок, закодированный в pET32/Nov9x, имел длину 584 ао, молекулярный вес 63,4 кДа, и соответствовал структуре Trx-Nov9x.

Плазмиды pET22/Nov9x и pET32/Nov9x трансформировали в клетки штамма BL21(DE3). Отобранных трансформантов засекали в 5 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина для получения накопительной культуры. На следующий день накопительную культуру засекали в 200 мл среды LB с ампициллином. По достижении оптической плотности OD=0,6-0,8 индуцировали экспрессию рекомбинантного белка добавлением изопропил-β-D-тиогалактозида (IPTG) до конечной концентрации 0,2 мМ. Инкубацию индуцированных культур проводили при 37°C, при перемешивании на скорости 150 об/мин. Накопление белка изучали путем отбора проб культуры через 2, 4, 6 и 24 ч. после добавления IPTG. Отбирали по 10 мл культуры, и из полученной аликвоты осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 мин биомассу клеток штамма-производителя. Осадок бактериальных клеток ресуспендировали в буфере TNE (50 мМ Trizma pH 7,4, 100 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА) и обрабатывали суспензию клеток ультразвуком (5 пульсов по 1 мин с паузами по 2 мин между пульсами). Озвученную суспензию осветляли центрифугированием (10000 об/мин, 30 мин, 4°C). С помощью белкового электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) исследовали белковый состав цитозольной фракции и осадков телец включения.

Для получения рекомбинантной фитазы в препаративном количестве использовали индуцированную культуру штамма-производителя BL21(DE3)/pET32/Nov9x в объёме 200 мл. Для препаративного выделения фитазы индукцию проводили в следующих условиях: 0,2 мМ IPTG, индукция в течение 6 ч при 37°C.

Очистка рекомбинантной фитазы металлохелатной хроматографией

Бактериальные клетки разрушали ультразвуком (30 пульсов по 1 мин с паузами по 1 мин между пульсами). Лизат осветляли центрифугированием и наносили на колонку HisTrap HP 1 ml (GE Healthcare). Очистку белка проводили с использованием хроматографа АКТА Purifier 10. Целевой белок смывали с колонки линейным градиентом концентрации имидазола (20-500 мМ) длиной 20 объёмов колонки. Градиент формировали в автоматическом режиме из буферов А (20 мМ имидазол, 50 мМ HEPES pH 7,0, 300 мМ NaCl, 5 мМ меркаптоэтанол) и В (500 мМ имидазол, 50 мМ HEPES pH 7,0, 300 мМ NaCl, 5 мМ меркаптоэтанол).

Приготовление субстратов для тестов на фитазную активность

В качестве природного субстрата фитазы использовали фитат натрия (Sigma, P8810) в концентрации 5 мкМ/мл (стоковый раствор). В реакциях ферментативного гидролиза для

определения активности фермента во фракциях после очистки, оптимальных рН и температуры, изучения термостабильности, к 1 объёму пробы фитазы добавляли 2 объёма раствора субстрата. Таким образом, конечная концентрация фитата в большинстве биохимических тестов, описанных в данной статье, была 3,33 мкМ/мл.

Ванадиево-молибденовый реактив

Для определения высвободившегося фосфата использовали колориметрическую реакцию с ванадиево-молибденовым реактивом. Для приготовления ванадиево-молибденового реактива 0,6 г метаванадата аммония (NH_4VO_3) растворяли в 440 мл воды, добавляли 560 мл 25% азотной кислоты и 25 г орто-молибдата аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$).

Калибровочная зависимость и определение активности фитазы

Для построения калибровочной зависимости в колориметрической реакции в качестве проб использовали стандартные растворы фосфата калия с концентрацией 0,5-2 мкМ/мл. Для определения активности фитазы 1 мл пробы смешивали с 2 мл раствора фитата натрия (5 мкМ/мл). Смесь инкубировали 15 мин. рН среды и температуру инкубации выбирали в соответствии с целью эксперимента. Например, для определения удельной активности использовали установленные стандартные условия – рН 5,5, 37°C. По завершении гидролиза фитата к 3 мл реакционной смеси добавляли 2 мл ванадиево-молибденового реактива и продолжали инкубацию для развития окраски раствора в течение 10 мин при комнатной температуре. Измеряли оптическую плотность при 410 нм.

Зависимость активности фитазы от рН среды и температуры

Для определения рН среды, оптимального для активности фитазы, к очищенному препарату фитазы добавляли буферный раствор в количестве, значительно превышающем объём препарата фермента (фракции фитазы после очистки разводили буфером в 40000 раз). Использовали следующие буферные системы: KCl-HCl (для диапазона рН 1-2), глицин-HCl (рН 2,6-3,5), ацетат натрия-уксусная кислота (рН 4-5,5), имидазол-HCl (рН 6,2-7,0), трис-гидрокси метиламинометан-HCl (рН 7,2-9,0). Составы и способы приготовления перечисленных буферных систем приведены в [10]. К пробе фитазы в соответствующем буфере добавляли фитат натрия и проводили гидролиз (15 мин, 37°C). После этого определяли количество высвободившегося фосфат-аниона колориметрическим методом.

Зависимость активности фитазы от температуры определяли при одном значении рН 5,5. Активность фитазы Nov9x определяли в температурном диапазоне 30 ... 80°C.

При определении концентрации фосфат-аниона, высвободившегося в ходе ферментативного гидролиза, для каждого значения вычисляли среднее арифметическое по трём повторностям.

Термостабильность рекомбинантной фитазы

В экспериментах по определению термостабильности пробу фитазы подвергали инкубации при 60 или 70°C в течение установленного интервала времени (от 20 мин до 2 ч). По истечении выбранного временного интервала пробу ставили в лёд до завершения инкубации всех проб в одном опыте. Остаточную активность фермента определяли в оптимальных условиях (37°C, рН 5,5). В отдельной серии экспериментов изучали возможность защиты рекомбинантной фитазы от тепловой денатурации в растворе путём добавления стабилизатора - желатина. Желатин добавляли в растворы для инкубации при повышенных температурах до конечной концентрации 1 мг/мл.

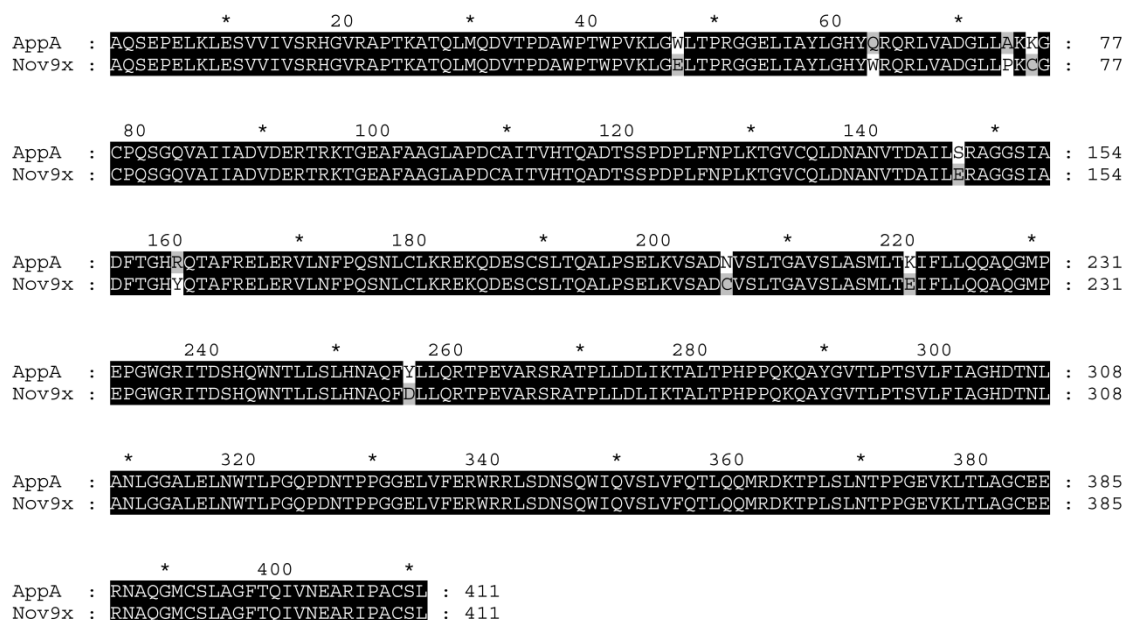
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Термостабильная рекомбинантная фитаза Nov9x

Поиск природных термостабильных фитаз, пригодных для использования в качестве кормовых ферментов, и создание термостабильных фитаз методами белковой инженерии получили большое развитие в связи с практической значимостью таких разработок. В комбикормовой промышленности корма обыкновенно подвергаются гранулированию при повышенных температурах (60-85°C), что необходимо для уничтожения патогенной микрофлоры (преимущественно бактерий из р. *Salmonella*) и формирования механически прочных гранул корма. Наибольшие успехи были достигнуты путём модификации природных фитаз методом направленной эволюции, в ходе которой повторяли раунды увеличения разнообразия последовательностей фермента с использованием мутагенеза *in vitro* и последующего отбора вариантов посредством высокопроизводительного скрининга.

Мы использовали в нашей работе фитазу, созданную путем насыщающего мутагенеза и направленной эволюции [11]. В работе [11] с использованием исчерпывающего мутагенеза была создана клонотека мутантных вариантов гена AppA *E.coli*. Клонотека была создана с таким расчётом, чтобы в ней присутствовали практически все теоретически возможные мутанты, которые можно получить путём замены аминокислот (19 возможных аминокислотных замен по каждой позиции в последовательности AppA длиной 431 ао). Путём высокопроизводительного скрининга были идентифицированы одиночные мутации, повышающие термостабильность фермента. Были отобраны 14 аминокислотных замен. Затем с использованием рекурсивной процедуры добавления мутаций в последовательность и оценки термостабильности полученных вариантов белка был создан фермент, который имеет 8 аминокислотных замен по сравнению с AppA. Созданная фитаза была названа Phy9x [11]. Фитаза Phy9x выдерживает без потери активности инкубацию в течение 1 ч при 62°C и сохраняет 27% от первоначальной активности после 10 мин инкубации при 85°C. Кроме этого, было показано, что Phy9x более устойчива к протеолитической инактивации по сравнению с AppA, в частности Phy9x в 3,5 раза более стабильна в желудке по сравнению с AppA [11]. Патент на созданную фитазу был приобретен компанией Syngenta, при этом название наиболее активного и термостабильного варианта было в патенте изменено с Phy9x на Nov9x. Под названием Nov9x указанная фитаза запатентована в семействе патентов, включающая международный патент WO2003057248, патент США US20030170293 и др. Рекомбинантный фермент, описанный в данной работе, отличается от фитазы из перечисленных патентов тем, что имеет на N-конце последовательность тиоредоксина *E. coli*. Для обозначения слитного белка мы используем название Ttx-Nov9x. В настоящее время американская компания Syngenta Animal Nutrition (США) поставляет на рынки фитазу Nov9x под торговой маркой Quantum Phytase, а европейская компания АВ Vista (Германия) продаёт этот фермент под торговой маркой Quantum Blue. Сравнение аминокислотных последовательностей Nov9x и AppA представлено на рисунке 1.

Увеличение термостабильности фермента Nov9x по сравнению с прототипным белком AppA объясняют действием ионных связей и «солевых мостиков». Аминокислотные замены привели к тому, что в структуре Nov9x присутствуют дополнительные ионные связи между погружёнными внутрь глобулы полярными аминокислотными остатками, которые стабилизируют третичную структуру.



Позиции элайнмента с совпадающими аминокислотными остатками показаны на чёрном фоне

Рисунок 1 – Сравнение последовательностей фитаз AppA (*E. coli*) и Nov9x

Positions in alignment with same residues are shown on black background

Figure 1 - Comparison of sequences of phytases AppA (*E. coli*) and Nov9x

Синтез *de novo* гена фитазы Nov9x

Фитаза Nov9x является неприродным ферментом; ген этого фермента невозможно получить из природных источников. Последовательность целевого гена была сконструирована *in silico* (рисунок 2); эта последовательность имеет состав кодонов, оптимизированный для экспрессии в *E. coli*. Для синтеза гена использовали метод конструктивной ПЦР, который предусматривает проведение ПЦР-амплификации в два раунда. Праймеры для первого раунда ПЦР обозначаются как «внутренние», праймеры для второго раунда ПЦР обозначаются как «фланкирующие». Каждый из «внутренних» праймеров на 100% гомологичен участку последовательности синтезируемого гена. «Внутренние» праймеры чередуются в порядке Sense-Antisense-Sense-Antisense. Совокупность «внутренних» праймеров покрывает всю длину гена, кроме концевых линкеров. Линкеры для клонирования закодированы во «фланкирующих» праймерах. На 5'-концах линкеров присутствуют уникальные сайты узнавания рестриктаз для удобства клонирования. В ходе синтеза гена *de novo* на первом раунде амплификации в реакционной смеси использовали смесь 32-х «внутренних» праймеров (P1+...+P32) в равной концентрации. Продукт первого раунда амплификации использовали в качестве матрицы для второго раунда амплификации, который проводили с использованием пары «фланкирующих» праймеров (PNco+PXho).



Указаны положения праймеров для синтеза гена *de novo*. Сайты NcoI и XhoI подчёркнуты

Рисунок 2 – Последовательность синтетического гена фитазы Nov9x

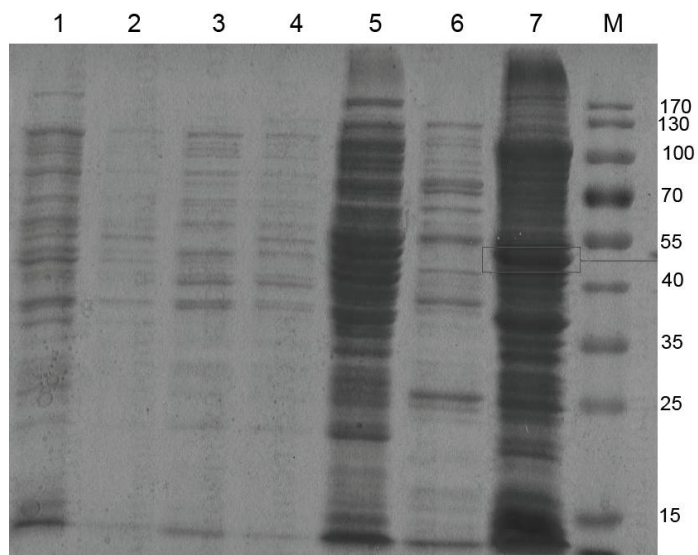
Positions of primers utilized for the *de novo* gene synthesis are indicated. Restriction sites NcoI and XhoI are underlined

Figure 2 - Sequence of the synthetic gene for Nov9x phytase

Экспрессия рекомбинантной фитазы

В созданных конструкциях для бактериальной экспрессии ген фитазы находился под контролем промотора РНК-полимеразы фага Т7. Это позволило получить рекомбинантную фитазу в штаммах *E. coli*, обеспечивающих индуцибельную продукцию РНК-полимеразы фага Т7, каким является, например, штамм BL21(DE3). Синтезированный нами ген фитазы кодировал белок, несущий на N-конце последовательность из 6-ти остатков гистидина – гистидиновую метку (N6His), которая позволяла очистить белок методом металлохелатной хроматографии.

Исследовали продукцию рекомбинантного белка в цитозольную фракцию и в тельца включения через различные интервалы времени после добавления химического индуктора. На рисунке 3 приведены результаты эксперимента по продукции рекомбинантного белка клетками штамма BL21(DE3), трансформированными плазмидой pET22/Nov9x; на рисунке 4 приведены результаты аналогичного эксперимента со штаммом-продуцентом, несущим плазмиду pET32/Nov9x.

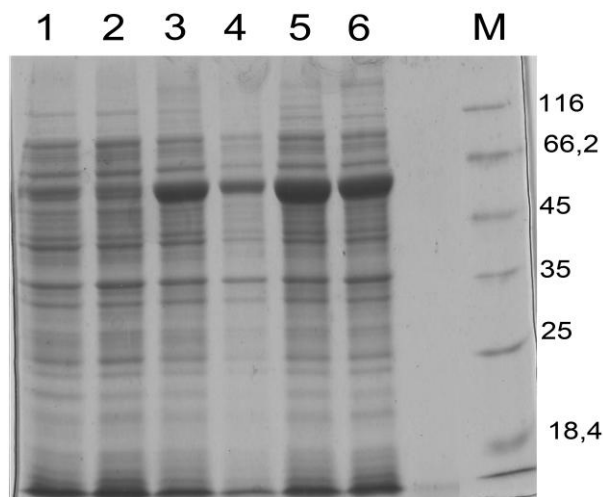


Дорожки 1, 2 - пробы до индукции; дорожки 3, 4 – через 2 ч после добавления IPTG; дорожки 5, 6 – через 4 ч после добавления IPTG; дорожка 7 – через 24 ч после добавления IPTG. Пробы представляют собой цитозольную фракцию (образцы 1, 3, 5, 7) или осадок телец включения (образцы 2, 4, 6). Дорожка М - маркер PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific), 10 кДа - 170 кДа

Рисунок 3 - Результаты SDS-PAGE белков из клеток штамма-продуцента, несущего конструкцию pET22/Nov9x

Lanes 1, 2 - probes before induction; lanes 3, 4 – probes upon 2 hrs induction with IPTG; lanes 5, 6 – probes upon 4 hrs induction; lane 7 - probe upon 24 hrs incubation in presence of IPTG. Probes represent proteins from soluble fraction (lanes 1, 3, 5, 7) or pellets (e.g. inclusion bodies) (samples 2, 4, 6). Lane M - PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific), 10 kD - 170 kD

Figure 3 - SDS-PAGE of proteins present in E.coli strain transformed with the construct pET22/Nov9x



Дорожки 1, 2 - пробы до индукции; дорожки 3, 4 – через 2 ч после добавления IPTG; дорожки 5, 6 – через 6 ч после добавления IPTG. Пробы представляют собой цитозольную фракцию (образцы 1, 3, 5) или осадок телец включения (образцы 2, 4, 6). Дорожка М - маркер Protein Molecular Weight Marker (ThermoScientific), 14,4 кДа - 116 кДа

Рисунок 4 - Результаты SDS-PAGE белков из клеток штамма-продуцента, несущего конструкцию pET32/Nov9x

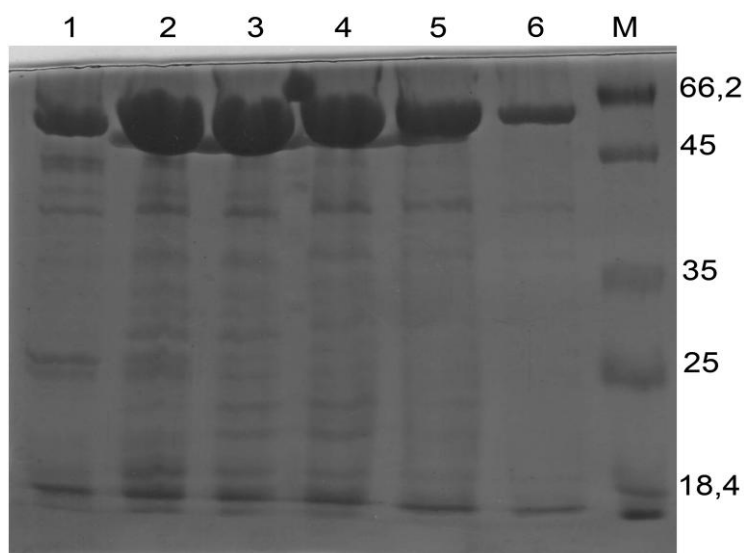
Lanes 1, 2 - probes before induction; lanes 3,4- probes upon 2 hrs induction with IPTG; lanes 5, 6- probes upon 6 hrs induction. Probes represent proteins from soluble fraction (lanes 1, 3, 5) or pellets (e.g. inclusion bodies) (samples 2, 4, 6). Lane M - Protein Molecular Weight Marker (ThermoScientific), 14,4 kD - 116 kD

Figure 4 - SDS-PAGE of proteins present in E.coli strain transformed with the construct pET32/Nov9x

Продукцию рекомбинантного белка в количествах, хорошо заметных в гелях SDS-PAGE, мы наблюдали при использовании экспрессирующей конструкции pET32/Nov9x. В индуцированных культурах штамма-продуцента BL21(DE3)/pET32/Nov9x, в цитозоль и в тельца включения нарабатывался белок с молекулярным весом ~63 кДа (рисунок 4).

Очистка рекомбинантной фитазы

Осветлённый лизат биомассы штамма BL21(DE3)/pET32/Nov9x из индуцированной культуры объёмом 200 мл был подвергнут металлохелатной хроматографии. В ходе элюции градиентом концентрации имидазола собирали элюат. Результаты анализа белкового состава собранных фракций представлены на рисунке 5. Белок с молекулярной массой ~63 кДа доминирует по весу во фракциях, соответствующих пику элюции.



Дорожки 1-6 – собранные фракции элюата (номера фракций 4-9). Дорожка М - маркер Protein Molecular Weight Marker (ThermoScientific), 14,4 кДа - 116 кДа

Рисунок 5 - Результаты SDS-PAGE фракций, соответствующих пику элюции рекомбинантного белка, продуцируемого штаммом BL21(DE3)/pET32/Nov9x

Lanes 1-6 – collected fractions (fractions nos 4-9). Lane M - Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific), 14,4 kD - 116 kD

Figure 5 - SDS-PAGE of fractions of eluate corresponding to the peak of elution of recombinant protein. The recombinant protein is produced in the BL21 (DE3)/pET32/Nov9x cells

Активность фитазы в препаратах очищенного белка

Ванадомолибдат аммония в кислых условиях реагирует с фосфат-анионом PO_4 с образованием неорганической гетерополикислоты, формулу которой можно представить в виде $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot \text{NH}_4\text{VO}_3 \cdot 16\text{MoO}_3$. Продукт реакции имеет жёлтый цвет (максимум поглощения 410 нм). В условиях эксперимента колориметрическая реакция демонстрировала почти линейный характер зависимости оптической плотности от концентрации фосфат-аниона в диапазоне концентраций фосфата 0,5-2 мкМ/мл (рисунок б). Линейный участок калибровочной зависимости использовали для определения количества фосфата, высвобождаемого в результате ферментативной реакции гидролиза фитата.

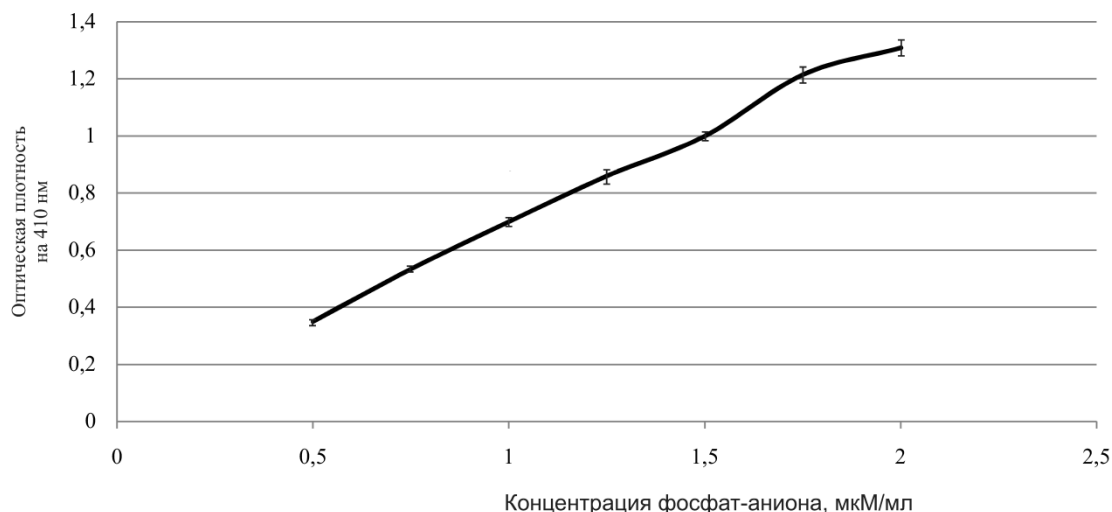
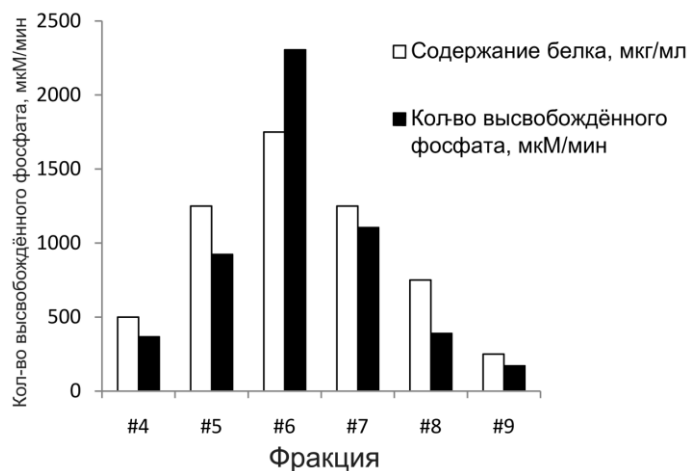


Рисунок 6 – Калибровочная зависимость, полученная путём тестирования стандартных растворов фосфата калия в реакции с ванадиево-молибденовым реактивом

Figure 6 - Reference curve, optical density of colored compound produced in reaction of standard solutions of potassium phosphate with the vanadium-molybdenum reagent

Фитаза эффективно гидролизует природный субстрат. Для измерения активности фитазы фракции элюата, собранные в результате очистки хроматографией, разводили в 40000 раз в буфере с рН 5,5. Результаты измерения активности фитазы в собранных фракциях представлены на рисунке 7.



Исследованы фракции, белковый состав которых представлен на рисунке 5

Рисунок 7 - Активность фитазы во фракциях, соответствующих пику элюции рекомбинантного белка

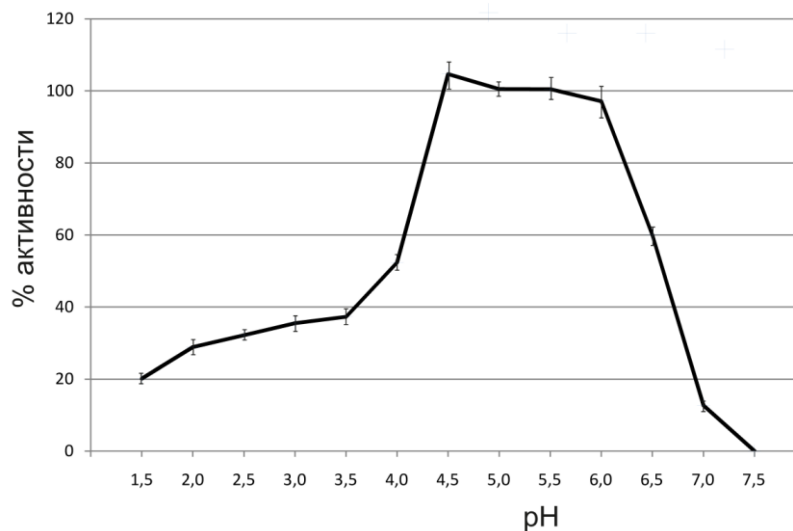
Protein content of the corresponding fractions was studied, results are shown in picture 5

Figure 7 - Phytase activity in fractions corresponding to the elution peak

После объединения фракций, соответствующих пику элюции рекомбинантного белка, концентрация белка в препарате составила 705 мкг/мл. Общий выход белка после очистки из 200 мл индуцированной культуры составил 2,1 мг. Фитазная активность препарата составила 2358 FTU/мл. Одна единица FTU определяется как количество фитазы, которое высвобождает 1 мкМ неорганического фосфата в минуту в оптимальных условиях (37°C, рН 5,5, избыток фитата натрия).

Зависимость активности фитазы от рН

График зависимости активности фитазы от рН среды, в которой проводился гидролиз фитата натрия, приведён на рисунке 8. Фитаза показывает пик активности при рН в диапазоне 4,5-6,0. В указанном диапазоне фитазная активность рекомбинантного белка Trx-Nov9x мало зависит от рН. Для практического использования этого фермента важно, чтобы полученная фитаза сохранила не менее 20% от максимальной активности в среде, соответствующей по показателю рН самой кислой в физиологически возможных условиях среде желудка (рН 1,5). Полученные результаты полностью соответствуют оптимуму рН для кислых гистидиновых фитаз, к классу которых относится Trx-Nov9x [11].



Активность фитазы выражена в % от максимального значения. Показаны средние по трём измерениям для каждого выбранного значения рН и интервал полученных значений

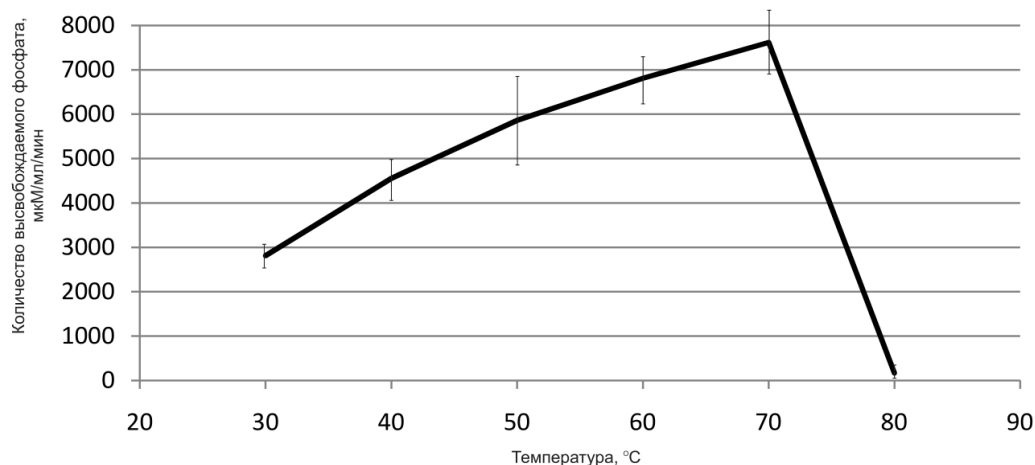
Рисунок 8 – Зависимость активности рекомбинантной фитазы от рН среды

Activity of phytase was determined as an average from three replicates. For each pH value, whiskers represent intervals between largest and lowest activity values

Figure 8 - Dependence of activity of the recombinant phytase from pH. Specific activity of the phytase is expressed as percents from max activity

Зависимость активности фитазы от температуры

В данном эксперименте фитазную активность рекомбинантного белка Trx-Nov9x измеряли в буфере с рН 5,5. Температуру реакции ферментативного гидролиза фитата натрия выбирали в диапазоне от 30 до 80°C. Скорость реакции ожидаемо росла при повышении температуры; при 70°C активность фермента превышала таковую при 30°C более чем в 2 раза. Фитазная активность почти линейно зависела от температуры в диапазоне температур 30 ...70°C (рисунок 9).



Показаны средние по трём измерениям для каждой выбранной температуры и интервал полученных значений

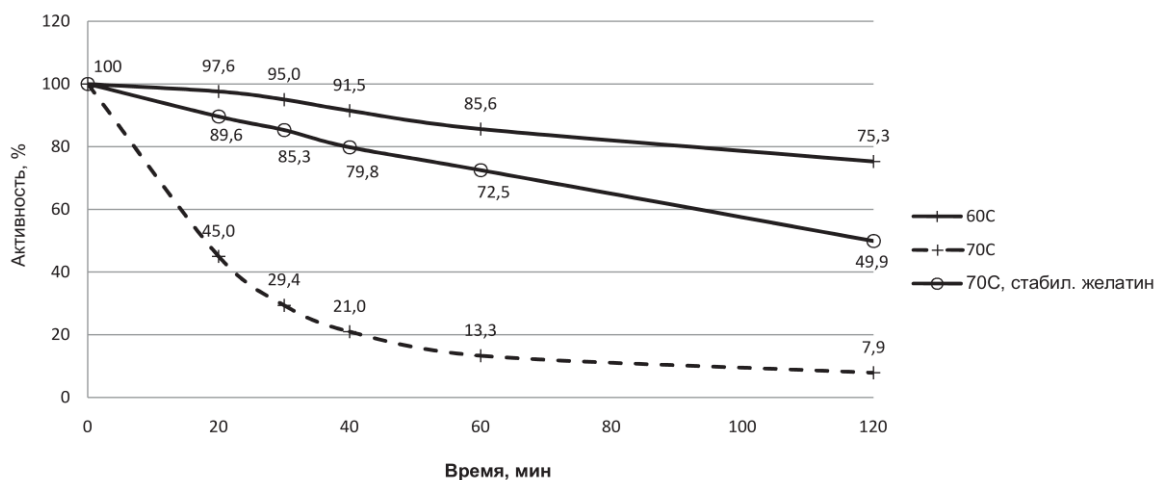
Рисунок 9 – Зависимость активности рекомбинантной фитазы от температуры проведения ферментативной реакции

Activity of phytase was determined as an average from three replicates. For each temperature, whiskers represent intervals between largest and lowest activity values

Figure 9 - Dependence of activity of the recombinant phytase from temperature of reaction mixture during hydrolysis of sodium phytate

Термостабильность рекомбинантной фитазы

Термостабильность для ферментов - это сохранение ферментативной активности после инкубации при повышенной температуре. Описанная в данной статье рекомбинантная фитаза Trx-Nov9x демонстрировала высокую термостабильность. Полученный фермент сохранил 75% активности после инкубации при 60°C в течение 2 часов (рисунок 10). Фермент сохранил 29% активности после инкубации при 70°C в течение 30 мин. Результаты измерения термостабильности фитазы Trx-Nov9x соответствовали опубликованным данным по термостабильности фитазы Phy9x [11].



Приведены результаты измерения активности после инкубации при 60°C или 70°C без добавления стабилизаторов или с добавлением стабилизатора - желатина. Значения активности выражены в % от исходной активности

Рисунок 10 – Термостабильность (сохранение активности) рекомбинантной фитазы

Upon incubation of enzyme at 60°C or 70°C without protectant or with addition of gelatine. Activity values are expressed as percents from the initial activity

Figure 10 - Thermostability (retention of activity) of the recombinant phytase

Была исследована возможность защиты рекомбинантной фитазы от денатурации при повышенных температурах путём добавления в раствор фермента другого белка, обладающего, по литературным данным, свойствами стабилизатора. В качестве стабилизатора применили желатин (1 мг/мл). Результаты эксперимента представлены на рисунке 10. В присутствии желатина термостабильность фитазы значительно возрастает: фитаза сохраняла ~50% активности после инкубации при 70°C в течение 2 ч. Данное наблюдение имеет практическое значение для создания термостабильных композиций кормовой фитазы. Представляет теоретический интерес изучение механизма защиты описанного фермента от тепловой денатурации в присутствии постороннего белка. Высокая термостабильность позволяет использовать описанный фермент в процессах производства кормов для животных с использованием термообработки.

ВЫВОДЫ

Рекомбинантная фитаза с высокой термостабильностью получена с выходом 2,1 мг с 200 мл индуцированной культуры в форме слитного белка с тиоредоксином *E. coli*. Наличие последовательностей тиоредоксина в структуре фермента не оказывало влияния на удельную активность. Удельная активность полученной фитазы составила 3344 FTU/1 мг. Полученная фитаза продемонстрировала биохимические характеристики, характерные для кислых гистициновых фитаз. При этом рекомбинантная фитаза демонстрировала высокую термостабильность, сохраняла 75% активности после инкубации при 60°C в течение 2 часов, или 29% активности после инкубации при 70°C в течение 30 мин. Полученные ген термостабильной фитазы, штамм-продуцент и фермент имеют перспективы использования при создании отечественной технологии производства ферментных кормовых добавок с фитазой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Harland B.F. & Morris E.R. Phytate: a good or a bad food component // Nutr Res. - 1995. - Vol. 15. - P. 733-754.
2. Selle P.H., Ravindran V., Caldwell A. & Bryden W.L. Phytate and phytase: consequences for protein utilisation // Nutr Res Rev. – 2000. - Vol. 13. - P. 255-278.
3. Luo H., Huang H., Yang P., Wang Y., Yuan T., Wu N., Yao B. & Fan Y. A novel phytase appA from *Citrobacter amalonaticus* CGMCC 1696: gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris* // Curr Microbiol. – 2007. - Vol. 55. - P. 185-192.
4. Konietzny U & Greiner R. Molecular and catalytic properties of phytase degrading enzymes (phytases) // Int J Food Sci Technol. – 2002. - Vol. 37. - P. 791-812.
5. Liu B.L., Rafiq A., Tzeng Y.M. & Rob A. The induction and characterization of phytase and beyond // Enzyme Microb. Technol. – 1998. - Vol. 22. - P. 415–424.
6. Vohra A. & Satyanarayana T. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications // Crit Rev Biotechnol. – 2003. - Vol. 23. - P. 29-60.
7. Mullaney E.J. & Ullah A.H. The term phytase comprises several different classes of enzymes // Biochem Biophys Res Commun. – 2003. - Vol. 312. - P. 179–184.
8. Oh B.C., Choi W.C., Park S., Kim Y.O. & Oh T.K. Biochemical properties and sub-strate specificities of alkaline and histidine acid phytases // Appl Microbiol Biotechnol. – 2004. - Vol. 63. - P. 362-372.
9. Wyss M., Brugger R., Kronenberger A., Remy R., Fimbel R., Oesterhelt G., Lehmann M. & van Loon A.P. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties // Appl Environ Microbiol. – 1999. - Vol. 65. - P. 367–373.

10. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика / Пер. с английского. - М.: Мир, 1991. - 544 с.

11. Garret J.B., Kretz K.A., O'Donoghue E., Kerovuo J., Kim W., Barton N.R, Hazlewood G.P., Short J.M. et al. (2004). Enhancing the Thermal Tolerance and Gastric Performance of a Microbial Phytase for Use as a Phosphate-Mobilizing Monogastric-Feed Supplement // *Appl Environ Microbiol.* - May 2004. - №70(5). – P. 3041–3046.

REFERENCES

1. Harland B.F., Morris E.R. Phytate: a good or a bad food component. *Nutr Res*, 1995, vol. 15, pp. 733-754. [http://dx.doi.org/10.1016/0271-5317\(95\)00040-P](http://dx.doi.org/10.1016/0271-5317(95)00040-P)

2. Selle P. H., Ravindran V., Caldwell A. & Bryden W. L. Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. *Nutr Res Rev.*, 2000, vol. 13, pp. 255-278. doi: 10.1079/095442200108729098

3. Luo H., Huang H., Yang P., Wang Y., Yuan T., Wu N., Yao B., Fan Y. A novel phytase appA from *Citrobacter amalonaticus* CGMCC 1696: gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. *Curr Microbiol.*, 2007, vol. 55, pp. 185-192. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.001>

4. Konietzny U., Greiner R. Molecular and catalytic properties of phytase degrading enzymes (phytases). *Int J Food Sci Technol.*, 2002, vol. 37, pp. 791-812. doi: 10.1046/j.1365-2621.2002.00617.x

5. Liu B.L., Rafiq A., Tzeng Y.M. & Rob A. The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme Microb. Technol.*, 1998, vol. 22, pp. 415–424. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb07097.x

6. Vohra A. & Satyanarayana T. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit Rev Biotechnol.*, 2003, vol. 23, pp. 29-60. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/713609297>

7. Mullaney E.J. & Ullah A.H. The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2003, vol. 312, pp. 179–184. 14630039. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.09.176

8. Oh B.C., Choi W.C., Park S., Kim Y.O. & Oh T.K. Biochemical properties and sub-strate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2004, vol. 63, pp. 362-372. 14586576. doi:10.1007/s00253-003-1345-0

9. Wyss M., Brugger R., Kronenberger A., Remy R., Fimbel R., Oesterhelt G., Lehmann M. & van Loon A.P. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Appl Environ Microbiol.*, 1999, vol. 65, pp. 367–373. 9925555

10. Douson R., Elliotte D., Elliotte U., Dzhons K. *Biokhimica*. - М.: Мир, 1991, 544 p.(Russ. ed.: Douson R., Elliotte D., Elliotte U., Dzhons K *Spravochnik biokhimica*. Moscow, Mir, 1991, 544 p.)

11. Garret J.B., Kretz K.A., O'Donoghue E., Kerovuo J., Kim W., Barton N.R, Hazlewood G.P., Short J.M. et al. (2004). Enhancing the Thermal Tolerance and Gastric Performance of a Microbial Phytase for Use as a Phosphate-Mobilizing Monogastric-Feed Supplement. *Appl Environ Microbiol.*, May 2004, no. 70(5), pp. 3041–3046. doi: 10.1128/AEM.70.5.3041-3046.2004

ТҮЙІН

Халық санының үнемі өсуі және ғаламдық көлемде халықтың қоректену сапасына талаптардың өсуі ауылшаруашылық малдың санын көбейтуін талап етеді. Мал үшін жем қорының тапшылығы жағдайында мал шаруашылығының одан әрі дамуы жем тиімділігінің жоғарылауын талап етеді. 80 жылдардан бастап дамыған елдерде, және соңғы кезде дамушы елдерде фитаттардан фосфатты босатып алу жолымен жемдердің қоректік құндылығын жоғарылату технологиясы таралып, экономикалық тиімділігін дәлелдеді. Фитаттар –

фитин қышқылының тұздары - өсімдіктерде фосфордың қор нысаны болып табылады. Айтылмыш технология жемдерге фитазаны қосуды ескереді. Фитазалар – фитаттарды ыдырататын ферменттер. Фитаза генінің *de novo* синтезі іске жүргізілді (химиялық бастамашыларынан). Nov9x фитазасы *E. coli* бактериясының табиғи AppA фитазасының технологиялық қасиеттерін жақсарту бойынша тәжірибелер нәтижесінде, генетикалық инженерия әдістерімен алынған табиғи емес ақуыз болып табылады. Берілген мақалада Nov9x фитазасының бактериалды экспрессиясы үшін екі генді-инженерлік құрылымдарының: pET22/Nov9x и pET32/Nov9x жасалуы баяндалған. Біз Nov9x фитазасын *E.coli* тиоредоксинімен біріккен ақуыз түрінде, ерігіш және ферменттік белсенді түрде алдық.

Тазалаудан кейін ақуыздың жалпы өнімі 200 мл индуцирленген дақылдан 2,1 мг құрады. Рекомбинантты фитазаның үлестік белсенділігі 3344 FTU/мг құрады.

Кілтті сөздер: фитаза, Nov9x, фермент, жемдік қоспа, плазмида, экспрессиялаушы құрылым, *E. coli* штамы, ген синтезі.