

Министерство образования и науки РФ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ  
КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

Направление: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) - биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНОЙ  
ФИТАЗЫ, ЭКСПРЕССИРУЕМОЙ РАЗНЫМИ ВИДАМИ ДРОЖЖЕЙ**

Работа завершена:

"\_\_" \_\_\_\_\_ 2018 г. Галимзянова (Г.А. Галимзянова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

к.б.н., н.с. НИЛ Биоинженерии и

биосинтеза ферментов, асс.

"\_\_" \_\_\_\_\_ 2018 г. Сулейманова (А.Д. Сулейманова)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

"\_\_" \_\_\_\_\_ 2018 г. Ильинская (О.Н. Ильинская)

Казань – 2018

<b>СОДЕРЖАНИЕ</b>	<b>стр.</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	3
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	4
<b>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	6
1.1 Фитиновая кислота	6
1.2 Фитазы	8
1.2.1 Классификация фитаз	11
1.2.2 Применение фитаз	14
1.3 Дрожжевые системы экспрессии	16
1.3.1 Использование дрожжей <i>Pichia pastoris</i> для получения рекомбинантных белков	17
1.3.2 Использование дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i> для получения рекомбинантных белков	20
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	23
<b>2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	23
2.1 Препараты рекомбинантной фитазы AgpP <i>Pantoea</i> sp. 3.5.1	23
2.2 Определение фитазной активности	25
2.3 Определение pH-оптимума	26
2.4 Определение pH-стабильности	27
2.5 Определение температурного оптимума	27
2.6 Определение термостабильности	27
2.7 Влияние двухвалентных ионов металла на активность фермента	27
2.8 Математическая обработка данных	27
<b>3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	28
<b>ВЫВОДЫ</b>	40
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	41

В течение последних 20-ти лет микробные фитазы привлекают особое внимание ученых, предпринимателей, биотехнологов и экологов. Фитазы нашли особенно широкое применение в таких отраслях, как сельское хозяйство и животноводство [Rafan Abd-Alhadi *et al.*, 2015].

Наиболее перспективными для производства фитаз в коммерческих масштабах считаются микробные продуценты. Микробные фитазы, осуществляющие гидролиз фитата, являются альтернативными и экономичными источниками фосфора. Микробные фитазы активно используют в качестве кормовых добавок, которые способствуют повышению биодоступности фосфора в организме моногастричных животных и уменьшают его выделение в окружающую среду. Однако не существует идеальной фитазы, способной удовлетворить все практические нужды. Поэтому ведется активный поиск новых фитаз, разработка эффективных систем продукции этих ферментов и изучение их свойств [Rafan Abd-Alhadi *et al.*, 2015].

Наиболее оптимальными эукариотическими системами экспрессии в получении рекомбинантных белков являются дрожжевые системы, в частности *P. pastoris* и *Y. lipolytica*. Дрожжи обеспечивают высокий уровень экспрессии гетерологичных белков, который у *P. pastoris* достигается за счет наличия сильного индуцибельного промотора AOX1 [Hmida-Sayari *et al.*, 2014], а у *Y. lipolytica* за счет гибридного промотора hp4d [Madzak *et al.*, 2004].

Ранее в нашей лаборатории был получен штамм *E.coli* BL21 pLysS pET28a/agpP, экспрессирующий фитазу *Pantoea* sp 3.5.1, и рекомбинантные штаммы дрожжей *Y. lipolytica* pINA1296/agpP и *P. pastoris* pPINK/agpP.

Рекомбинантный штамм *P. pastoris* pPINK-НС/AgpP был получен путем интеграции в геном генетической конструкции на основе интегративной дрожжевой плазмиды pPINK-НС-inulinase-AgpP, содержащей оптимизированный для экспрессии в дрожжах ген фитазы *agpP Pantoea* sp.

3.5.1 и последовательности сигнального пептида гена инулиназы *Kluveromyces marxianus*, находящихся под контролем промотора AOX1.

Рекомбинантный штамм *Yarrowia lipolytica* pINA1296/agpP был получен путем интеграции в геном дрожжевой плазмиды pINA1296/agpP, содержащей оптимизированный для экспрессии в дрожжах ген фитазы *agpP* *Pantoea* sp. 3.5.1, находящийся под контролем сильного гибридного промотора hp4d. Экспрессионный вектор pINA1296 содержит последовательность сигнального пептида гена щелочной протеазы XPR2, позволяющую осуществлять секрецию гетерологичного белка.

При создании конструкций pPINK-HC-inulinase-AgpP и pINA1296/agpP к структурной области гена фитазы *agpP* добавляли C-терминальный гистидиновый таг (His-tag), позволяющий детектировать белок с помощью иммуноблоттинга и проводить очистку фермента из культуральной жидкости дрожжей при помощи аффинной хроматографии. Электрофореграмма очистки фитаз представлена на рисунках 10-12.

Представляло интерес изучить и сравнить свойства рекомбинантных фитаз, экспрессируемых дрожжами *P. pastoris* (AgpP-P) и *Y. lipolytica*, (AgpP-Y) и бактериальной экспрессионной системой на основе *E. coli* (AgpP-E).

### 3.1 pH-оптимум

Важнейшим фактором, влияющим на активность фермента является pH раствора [Труфанов, 2011]. Мы определяли pH-оптимум рекомбинантной фитазы AgpP-P и AgpP-Y в интервале значений pH от 1.0 до 9.0.

Установлено, что рекомбинантная фитаза AgpP-P проявляла максимум своей активности при кислых значениях pH – от 2.0 до 4.0. Фермент проявлял около 20% от своей активности при значениях pH выше 7.0 (рисунок 13). Максимум фитазной активности фермента AgpP-Y приходился также на значение pH 3.0 (рисунок 13). При pH 1.0 и выше 7.0 фермент проявлял около 20 % от своей активности.

Рекомбинантные фитазы, полученные в дрожжевых системах экспрессии обладали более высокой активностью в кислых значениях рН, чем фитаза экспрессируемая *Escherichia coli* (AgpP-E), и сохраняли около 20% при щелочных значениях, тогда как AgpP-E полностью ингибировалась при рН выше 5.0.

Фитаза AgpP относится к гистидиновым кислым фитазам, которые имеют рН-оптимум в кислых значениях рН. Например, фитаза *K. terrigena* (appA2) проявляла максимальную активность при рН 5.0 [Greiner *et al.*, 1997]. Однако установлено, что микробные фитазы *B. subtilis*, *P. simplicissimum*, *A. niger* (PhyB) отличаются друг от друга рН-оптимумом, активность которых приходится на рН 7.0 [Oh *et al.*, 2004], 4.0 [Lei *et al.*, 2013] и 2.5 [Sariyska *et al.*, 2005], соответственно.

При дефосфорилировании фитата в желудочно-кишечном тракте кур необходимо учитывать низкий уровень рН (4-5) в переднем (кардиальном) отделе желудка, а также в железистом и мускульном желудке (рН 2-5). [Menezes-Blackburn, Greiner *et al.*, 2014]. Тогда как тонкий кишечник у кур представляет собой нейтральную среду с рН 6.5-7.5 [Zyła *et al.*, 1999]. Именно рН-оптимум фитаз определяет их способность проявлять каталитическую активность в вышеупомянутых отделах желудочно-кишечного тракта кур [Greiner *et al.*, 2010].

Таким образом, ферменты, экспрессированные в дрожжевых системах экспрессии, проявляют наибольшую активность при кислом значении рН - 3.0-4.0, а значит, будут активны при дефосфорилировании фитата в переднем, железистом и мускульном желудке кур.

### 3.2 рН-стабильность

В пищеварительном тракте кур фермент будет проходить через отделы пищеварения, рН которых значительно отличаются друг от друга (рисунок 14) [Островский, 2004]. Для проявления своей максимальной

активности, фермент не должен инактивироваться под действием различных рН в ЖКТ кур.

Определяли рН-стабильность рекомбинантных фитаз, экспрессируемых дрожжами *Y. lipolytica* (AgpP-Y) и *P. pastoris* (AgpP-P), в течении 1 ч в интервалах значений рН 1.0-9.0. Установлено, что фитаза AgpP-P, сохраняла более 80% от своей изначальной активности при кислых значениях рН от 2.0 до 5.0, однако, при щелочных рН (8.0-9.0) активность фермента полностью ингибировалась (рисунок 15). Профиль рН-стабильности AgpP-P схож с таковым у AgpP-E. Тогда как рекомбинантная фитаза AgpP-Y была полностью стабильна в диапазоне рН 3.0-6.0 и сохраняла свою активность (30% и более) при щелочных значениях рН, (рисунок 15). Каждый фермент стабилен в соответствующих ему значениях рН, поскольку при изменении рН среды меняется конформация белковой молекулы, его активного центра и, следовательно, способность осуществлять катализ [Ничаев, 2007]. При инкубации бактериальной фитазы *E.coli* (AppA), экспрессированной в *P.pastoris*, в течение 30 минут при различных значениях рН фермент сохранял максимальную активность (100%) при рН 5.0. При рН 7.0 и выше фитаза AppA инактивировалась, по мере уменьшения рН активность снижалась и полностью инактивировалась при рН 2.0 [Kirillov *et al.*, 2016].

Таким образом, рекомбинантная фитаза, полученная на основе *P.pastoris* наиболее стабильна при значениях рН от 2.0 до 5.0, а фитаза, экспрессированная *Y. lipolytica* - в диапазоне рН от 3.0 до 6.0, что дает возможность использовать их в качестве кормовой добавки для кур, поскольку данные ферменты не будут инактивироваться, проходя через отделы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) кур.

### 3.3 Температурный оптимум

Внутренняя температура тела курицы колеблется в пределах 40-42°C. Важным критерием эффективности ферментов в качестве кормовых добавок

является их способность проявлять высокую активность при данной температуре. В связи с этим необходимо изучение температурного оптимума ферментов [Редкозубов, 2014].

При исследовании влияния температуры на активность рекомбинантных фитаз AgpP-P и AgpP-Y было установлено, что максимальную активность фитаза AgpP-P проявляла при температуре 50 °С, тогда как температурный оптимум фитазы AgpP-Y составил 45 °С (Рисунок 16). Температурный оптимум рекомбинантной фитазы, экспрессированной в *E.coli* (AgpP-E) составил 60 °С (Рисунок 16).

Все рекомбинантные ферменты обладали высокой активностью при температуре тела кур, а значит, будут способны к эффективному гидролизу фитатов в организме птицы.

### 3.4 Термостабильность

В настоящее время термостабильность кормовых ферментов является важной проблемой при изготовлении кормов, поскольку гранулирование кормов осуществляется при высоких температурах (60-80 °С). Не смотря на то, что альтернативные технологии позволяют распылять фитазы на корма после гранулирования, что позволяет избежать тепловой денатурации фермента, термостабильные фитазы все же являются более предпочтительными кандидатами для использования в качестве кормовых добавки [Труфанов, 2011].

На следующем этапе мы изучали влияние температуры в диапазоне от 4 °С до 70 °С на стабильность ферментов. Рекомбинантный фермент AgpP-P обладал исключительной термостабильностью и сохранял 100% своей активности при температуре от 4 °С до 70 °С (рисунок 17). Рекомбинантная фитаза AgpP-Y обладала термостабильностью в диапазоне температур от 4 °С до 60 °С (рисунок 17). Экспрессия фитазы в дрожжевых системах позволила значительно увеличить термостабильность фермента, по сравнению с фитазой, полученной с помощью бактериальной системы экспрессии.

Так, М.Р. Roy, и D. Mazumdar сравнивали свойства фитазы (appA) *Shigella sp. CD2*, экспрессированной в *P. pastoris* и *E. coli*. В результате этого исследования было установлено, что биохимические свойства этих фитаз схожи, за исключением термостабильности, которая, вероятно, связана с процессом гликозилирования, проводимым дрожжами. Повышенный уровень гликозилирования увеличивает термостабильность белка. Для *E. coli* не характерен процесс гликозилирования и поэтому фермент при увеличении температуры быстро инактивируется [Roy, Mazumdar *et al.*, 2016].

Таким образом, установлено повышение термостабильности фитаз, экспрессированных в дрожжевых системах экспрессии, что позволит им подвергаться процессу гранулирования корма без значительных потерь ферментативной активности.

### 3.5 Влияние ионов металлов на активность фермента

Наиболее важным аспектом полноценного питания животных, с однокамерным желудком, является микроэлементное питание, в частности, медь ( $Cu^{+2}$ ), цинк ( $Zn^{+2}$ ), железо ( $Fe^{+2}$ ), марганец ( $Mn^{+2}$ ). Для обогащения рационов вышеупомянутыми микроэлементами их вводят в составе премиксов, чаще всего в неорганической форме. Ранее было установлено, что некоторые ионы металлов могут ингибировать активность ряда ферментов, включая фитазы [Tran *et al.*, 2011]. В связи с этим представляло интерес изучить влияние ионов металлов на активность рекомбинантных фитаз.

Изучение влияния ионов двухвалентных металлов на активность рекомбинантных фитаз, экспрессированных в *E. coli*, *P. pastoris* и *Y. lipolytica*, позволило установить, что ионы  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  в концентрации 1 мМ повышали активность ферментов более чем в два раза. Ионы  $Co^{2+}$  в той же концентрации не так сильно влияли на активность фитаз, тогда как ионы  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  ингибировали активность ферментов в среднем на 55%, 45% и 40%, соответственно (Рисунок 18). Экспрессия



фитазы в разных экспрессионных системах никак не повлияла на активацию или ингибирование фермента ионами дивалентных металлов.

Kirillov S., Silayev D. исследовали влияние ионов металлов на активность ферментов. Результаты показали, что фитаза, экспрессируемая в *P. pastoris*, умеренно ингибировалась ионами  $\text{Co}^{2+}$ , тогда как в присутствии  $\text{Fe}^{2+}$  активность значительно ингибировалась. Установлено, что ионы  $\text{Ca}^{2+}$  усиливают фитазную активность [Kirillov *et al.*, 2016].

Ингибиторный эффект некоторых металлов обусловлен не только прямым действием иона на сам фермент, но и формированием трудно растворимых фитатных комплексов. Например, добавление иона железа  $\text{Fe}^{2+}$  к реакционной смеси ведет к образованию преципитата и снижению концентрации доступного для реакции субстрата в связи с формированием нерастворимых железо-фитатных комплексов [Konietzny *et al.*, 1995].

Таким образом, ионы двухвалентных металлов одинаково влияют на активность рекомбинантных фитаз.

## ВВЕДЕНИЕ

Необходимым элементом в жизнедеятельности всех организмов является фосфор. Он участвует в метаболических процессах, входит в состав нуклеиновых кислот, аденозинтрифосфата (АТФ), аминокислот, фосфолипидов и играет важную роль в питании животных, участвует в обмене веществ, выполняет энергетическую функцию [Канжигалина, 2013].

Проблема недостатка усвояемого фосфора в кормах животных обусловлена тем, что в кормовом зерне значительная часть фосфора присутствует в виде нерастворимых комплексов фитиновой кислоты – фитатов [Chen *et al.*, 2015]. Фитиновая кислота является основной формой хранения фосфора в семенах растений и способна образовывать комплексы с ионами двувалентных металлов. Такие комплексы недоступны для вовлечения в питание моногастричных животных, в организме которых отсутствуют ферменты, необходимые для их гидролиза. Вследствие чего неусвоенный фосфор в избыточном количестве выделяется вместе с фекалиями животных, нанося при этом вред окружающей среде. Из-за низкого содержания доступного фосфора, в корма вводят неорганические фосфаты, что в значительной степени увеличивает их стоимость.

Гидролиз фитата в природе осуществляется ферментами – фитазами, которые способны к поэтапному дефосфорилированию фитатов с образованием производных инозитола и свободных фосфатов. Микробные фитазы широко используют в качестве кормовых добавок для сельскохозяйственных животных. Несмотря на большое количество фитаз на мировом рынке, учеными постоянно ведется поиск новых ферментов с улучшенными свойствами. Однако для применения микробных фитаз в агробιοтехнологии необходимо получить эффективную систему продукции этого фермента и изучить его биохимические свойства.

**Целью** данной работы является сравнительная характеристика бактериальной фитазы, экспрессируемой разными видами дрожжей: метилотрофными дрожжами *Pichia pastoris* и дрожжами *Yarrowia lipolytica*.

В связи с поставленной целью решались следующие **задачи**:

- 1) Изучить влияние значений pH на активность и стабильность рекомбинантных фитаз, экспрессируемых дрожжами *P. pastoris* и *Y. lipolytica*.
- 2) Установить влияния температуры на активность и стабильность рекомбинантных фитаз, экспрессируемых разными дрожжами.
- 3) Исследовать влияние ионов двухвалентных металлов на активность рекомбинантных фитаз, экспрессируемых *P. pastoris* и *Y. lipolytica*.

## ВЫВОДЫ

1) Максимум активности рекомбинантных фитаз, экспрессируемых дрожжами *P. pastoris* (AgpP-P) и *Y. lipolytica* (AgpP-Y), приходился на pH 3.0-4.0. Фитаза AgpP-P сохраняла более 80% от своей изначальной активности при кислых значениях pH от 2.0 до 5.0, однако, при щелочных pH (8.0-9.0) активность фермента ингибировалась. Фитаза AgpP-Y была стабильна в диапазоне pH 3.0-6.0 и сохраняла свою активность (30% и более) при щелочных значениях pH.

2) Единственный температурный оптимум рекомбинантной фитазы AgpP-P соответствовал 50°C, фитазы AgpP-Y – 45°C. Рекомбинантные ферменты AgpP-P и AgpP-Y сохраняли активность при температуре от 4°C до 70°C и от 4°C до 60°C, соответственно.

3) Ионы двувалентных металлов в концентрации 1 мМ одинаково влияли на активность рекомбинантных фитаз: ионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  повышали активность ферментов более чем в два раза, ионы  $\text{Co}^{2+}$  не влияли на активность фитаз, тогда как ионы  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$  ингибировали активность ферментов.