

Министерство образования и науки РФ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

Специальность: 012400 (ОКСО 020209) – микробиология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ДЛЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ  
ЭКСПРЕССИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФИТАЗЫ  
РЕКОМБИНАНТНЫМИ ДРОЖЖАМИ *PICHLIA PASTORIS***

Работа завершена:

"\_\_" \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.



(П.Р.Хузина)

Работа допущена к защите:

Научные руководители  
к.б.н., н.с.,

"\_\_" \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.



(Л.Р. Валеева)

д.б.н., профессор,

"\_\_" \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.



(М.Р. Шарипова)

Заведующий кафедрой  
ак. АН РТ, д.б.н., профессор

"\_\_" \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.



(О.Н. Ильинская)

Казань–2018

## СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	4
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	6
1.1 Фитазы–группа специфических фосфогидролаз	6
1.1.2 Классификация и характеристика фитаз	8
1.1.2.1 Гистидиновые кислые фосфатазы (НАРs)	9
1.1.2.2 Пурпурнокислые фитазы (РАРs)	11
1.1.2.3 $\beta$ -пропеллерные фитазы	11
1.1.3 Функции фитаз	12
1.2 Применение бактериальных фитаз	13
1.2.1 Бактериальные фитазы в животноводстве	15
1.3 Экспрессионные системы бактериальных фитаз	16
1.3.1 Дрожжевые системы экспрессии	18
1.4 Оптимизация гетерологичной экспрессии	19
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	29
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	29
2.1 Штаммы дрожжей и питательные среды	29
2.2 Электрофорез в ПААГ	31
2.3 Вестерн-блоттинг	32
2.4 Определение фитазной активности	32
2.5 Концентрация белка	33
2.6 Статистическая обработка данных	33
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	34
3.1 Оптимизация роста штаммов <i>P. pastoris</i> 1.8 и 2.5 при различных условиях рН среды	34
3.2 Оптимизация концентрации индуктора экспрессии рекомбинантной фитазы в среде	38
3.3 Влияние разных источников фосфора на рост рекомбинантных штаммов и экспрессию фитазы	43

<b>ВЫВОДЫ</b>	47
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	48

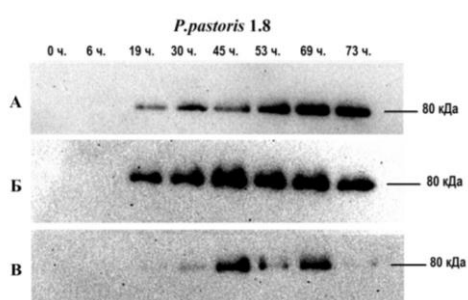
Недостаток фосфора в питании животных и растений является серьезной проблемой, затрагивающей как природные, так и искусственные экосистемы, в частности, сельское хозяйство. В составе кормов растительного происхождения большую долю фосфатов составляет органическое соединения фитат, крайне устойчивый к разложению. Решением проблемы высокого содержания фитата в кормах является использование специфических ферментов фитаз, гидролизующих фитат и высвобождающих фосфат. Актуальным является разработка новых систем гетерологичной экспрессии бактериальных фитаз в рекомбинантных штаммах дрожжей в связи с простотой их культивирования и очистки продукта. Важным этапом гетерологичной экспрессии является оптимизация условий культивирования, позволяющая достичь наибольшего выхода продукта с высокой активностью.

**Влияние pH на рост *P. pastoris* и экспрессию рекомбинантной фитазы AgpP *Pantoea* sp. 3.2.1.** Нами было исследовано влияние pH среды (6.0, 4.5, 3.5) на рост рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris*. Максимальные значения плотности культур для обоих штаммов *P. pastoris* 1.8 и 2.5 были определены при культивировании на среде с pH 6.0. Однако понижение pH среды до 4.5 и 3.5 незначительно влияет на динамику роста штаммов 1.8 и 2.5.

Таким образом, изменение pH среды не влияет на рост культур рекомбинантных дрожжей *P. pastoris*, и для экспрессии фитазы могут быть использованы среды с более низкими значениями pH, что может способствовать ингибированию собственных дрожжевых протеаз.

Провели вестерн-блот анализ экспрессии фитазы рекомбинантными штаммами дрожжей *P. pastoris* 1.8 и 2.5 при различных значениях pH среды. Установили, что максимальный уровень экспрессии рекомбинантной фитазы штаммом *P. pastoris* 1.8, полученный на основе высококопийной плазмиды pPINK-НС, соответствует 45-69 ч индукции экспрессии в среде с pH 4.5, причем экспрессия установлена, начиная с 19 ч и заканчивая 73 ч индукции

(Рисунок 1). При рН 6.0 максимальная экспрессия соответствовала 53-69 ч индукции, однако уровень индукции ниже по сравнению с уровнем индукции при рН 4.5. Тогда как в среде с рН 3.5 экспрессия фитазы была снижена, экспрессия установлена с 45 по 69 ч индукции. Штамм *P.pastoris* 2.5, в получении которого использовали конструкцию на основе низкокопийной плазмиды рPINK-LC, стабильно экспрессировал рекомбинантную фитазу при рН 6.0 с 19 ч индукции по 73 ч, максимальная экспрессия соответствовала 69-73 ч индукции. При рН 4.5 и 3.5 уровень экспрессии был ниже, чем при рН 6.0.



**Рисунок 1** - Анализ экспрессии рекомбинантной фитазы AgpP штаммом дрожжей *Pichia pastoris* 1.8 при различных значениях рН среды. А – рН 6.0; Б – рН 4.5; В – рН 3.5.

Исследовали внеклеточную фитазную активность штаммов при разных рН среды. Показали, что штамм *P. pastoris* 1.8 обладает наибольшей фитазной активностью при рН 4.5, что коррелирует с результатами анализа экспрессии. При рН 6.0 также увеличивалась с 30 по 73 ч индукции. При рН 3.5 активность не изменялась в течение роста культуры.

Штамм 2.5 обладал максимальной фитазной активностью при рН 6.0 на 69-73 ч роста культуры. При рН 4.5 и 3.5 фитазная активность была ниже и незначительно увеличивалась в течение всего периода индукции экспрессии.

**Влияние различных концентраций индуктора (метанола) на рост *P. pastoris* и экспрессию рекомбинантной фитазы AgpP *Pantoea* sp. 3.2.1.** Провели исследование экспрессии гетерологичной фитазы при различных концентрациях индуктора (метанола). При добавлении метанола в среду в конечной концентрации 2.0% наблюдали частичную деградацию белка и низкий уровень экспрессии фитазы. При концентрации метанола 0.1% также

наблюдали частичную деградацию белка. Тогда как при концентрации метанола 0.5% экспрессируемая фитаза не разрушалась.

Внеклеточная фитазная активность штамма *P. pastoris* 2.5 при росте на средах с разной конечной концентрацией метанола значительно не изменялась. Однако на среде с концентрацией метанола 2.0% активность снижалась, по сравнению с концентрацией метанола 0.5%.

**Влияние источника фосфата на рост *P. pastoris* и экспрессию рекомбинантной фитазы AgpP *Pantoea* sp. 3.2.1.** Провели исследования влияния разных источников фосфата на рост рекомбинантных штаммов и экспрессию фитазы. При добавлении фитата в качестве единственного источника фосфата в среде штаммы *P. pastoris* 1.8 и 2.5 экспрессировали рекомбинантную фитазу, начиная с 25 ч до 72 ч индукции. Однако при росте штаммов на среде с фитатом внеклеточная фитазная активность отсутствовала.

Таким образом, мы исследовали влияние различных факторов на рост штаммов *P. pastoris* 1.8 и 2.5, с интегрированным геном гистидиновой кислотной бактериальной фитазы, и внеклеточную экспрессию фитазы. Показано, что pH среды, концентрация индуктора (метанола) и источник фосфата не оказывают существенного влияния на рост рекомбинантных штаммов дрожжей. Однако при конечной концентрации метанола в среде 0.1% и 2.0% уровень экспрессии снижался и наблюдалась частичная деградация внеклеточного белка. Оптимальным pH для экспрессии внеклеточной фитазы были pH 4.5 и 6.0 для штаммов 1.8 и 2.5, соответственно. Максимальный уровень экспрессии и максимальная внеклеточная фитазная активность соответствовали 45-69 ч индукции экспрессии (штамм 1.8) и 69-73 ч индукции экспрессии (штамм 2.5). Оптимальная конечная концентрация метанола в среде – 0.5%. Рекомбинантные штаммы, экспрессирующие фитазу, способны расти и экспрессировать активную фитазу на среде с фитатом в качестве единственного источника фосфора.

## ВВЕДЕНИЕ

Изменения в минеральном питании серьезно сказываются на функционировании всех живых организмов, что ведет к угнетению их роста и развития. Наиболее распространенной формой дефицита минерального питания является недостаток фосфора. Большая часть природных соединений фосфора в почве и в кормах растительного происхождения представлена его органическими формами, среди которых основную долю составляет фитат (*мио*-инозитол гексакисфосфат), труднодоступный для усвоения животными. Однако, многие микроорганизмы способны усваивать фосфор из молекул фитата за счет экспрессии специфических ферментов – фитаз. В связи с этим, перспективным направлением повышения усвоения фосфора является обработка фитат-содержащего сырья микробными фитазами, высвобождающими фосфаты. Однако, получение фитаз из природных штаммов бактерий не эффективно из-за низкого уровня экспрессии и сложности очистки фермента. Таким образом, актуальным является разработка новых систем гетерологичной экспрессии бактериальных фитаз. Наиболее перспективна экспрессия бактериальных фитаз в рекомбинантных штаммах дрожжей в связи с простотой их культивирования и очистки продукта. Важным этапом гетерологичной экспрессии является оптимизация условий культивирования, позволяющая достичь наибольшего выхода продукта с высокой активностью.

Цель работы – подбор оптимальных условий экспрессии рекомбинантной гистидиновой кислотой фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 (AgpP) в дрожжах *Pichia pastoris*.

В ходе работы решались следующие задачи:

- 1) Оптимизировать pH среды культивирования для роста рекомбинантных штаммов дрожжей *P. pastoris* и эффективной экспрессии фитазы AgpP.

- 2) Исследовать влияние разных концентраций индуктора (метанола) на рост рекомбинантных штаммов *P. pastoris* и экспрессию фитазы AgpP.
- 3) Исследовать влияние разных источников фосфата на рост рекомбинантных штаммов *P. pastoris* и экспрессию фитазы AgpP.



## ВЫВОДЫ

- 1) pH-Оптimum среды культивирования для роста рекомбинантных штаммов дрожжей и экспрессии фитазы AgpP соответствует значениям 4.5 и 6.0 для штаммов *P. pastoris* 1.8 и 2.5, соответственно. Максимальная экспрессия AgpP наблюдалась на 45-69 ч индукции для штамма 1.8 и на 69-73 ч индукции для штамма 2.5.
- 2) Оптимальная конечная концентрация индуктора (метанола) в среде для роста рекомбинантных штаммов *P. pastoris* и экспрессии фитазы AgpP составляет 0.5%. Концентрация метанола 0.1% и 2.0% приводила к снижению экспрессии фитазы.
- 3) Рекомбинантные штаммы *P. pastoris* при культивировании на среде с фитатом в качестве единственного источника фосфата отличались снижением оптической плотности в 1.5 раза и отсутствием фитазной активности по сравнению с ростом на среде, где в качестве источника фосфора добавляли неорганический фосфат.