

УДК 577.112.083

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *Komagataella phaffii*

© 2020 г. С. Ю. Филькин¹, Н. В. Чертова¹, Е. А. Вавилова¹, С. С. Зацепин¹,
М. А. Эльдаров², Э. Г. Садыхов¹, А. Н. Фёдоров¹, А. В. Липкин¹, *

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

*e-mail: lipus57@yahoo.com

Поступила в редакцию 15.05.2020 г.

После доработки 30.06.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

Получен эффективный рекомбинантный штамм *Komagataella phaffii*, с высоким выходом продуцирующий прохимозин *Bos taurus*. Разработан метод выделения и очистки рекомбинантного химозина, включающий двухстадийную очистку методами ионнообменной и гидрофобной хроматографии. Получен препарат высокоочищенного (~90%) рекомбинантного химозина с концентрацией 4 мг/мл (1000 ИМСУ/мл) с выходом 62%. Разработанная методика может быть использована при промышленном производстве фермента.

Ключевые слова: химозин, метилотрофные дрожжи, *Pichia pastoris*, *Komagataella phaffii*

DOI: 10.31857/S0555109920060057

Химозин (КФ 3.4.23.4) – аспартазная эндопептидаза обладает специфической протеолитической активностью в отношении пептидной связи Phe105–Met106 [1]. Результатом проявления протеолитической активности химозина является формирование молочного сгустка, что чрезвычайно важно при изготовлении продукции в сыроделии и пищевой промышленности. Штаммы-продуценты на основе *Aspergillus niger* [2] и *Kluyveromyces lactis* [3] активно используются в современной промышленности для продукции рекомбинантного химозина. Создание эффективных штаммов-продуцентов ферментов на основе *Komagataella phaffii* (ранее – *Pichia pastoris*) является важной прикладной задачей промышленной биотехнологии [4, 5].

Ранее была оптимизирована нуклеотидная последовательность для экспрессии в *K. phaffii* [6], получены клоны штамм-продуцентов [7], разработаны методы культивирования при использовании технического глицерина [8]. Однако, достигнутые уровни продуктивности штамм-продуцентов не соответствуют достигнутым уровням в промышленных штаммах-продуцентах *A. niger* и *K. lactis*. Существующие методы позволяют оптимизировать штаммы-продуценты *K. phaffii* как в результате оптимизация метаболизма с увеличением выхода промежуточных интермедиатов и

конечных метаболитов; улучшения механизма геномных интеграций, позволяющих увеличить эффективность встраивания экспрессионных кассет; оптимизации мультикопийных инсерций методами генетической инженерии; геномного редактирования методами CRISPR/Cas9; коэкспрессии генов для улучшения внутриклеточного транспорта и секреции, а также коэкспрессии шаперонов для улучшения белкового фолдинга [9].

Цель работы – получение высокоэффективного штамма-продуцента химозина в *K. phaffii* и разработка методов выделения и очистки для использования в промышленной биотехнологии.

МЕТОДИКА

Материалы. Для получения штамма-продуцента использовали ген прохимозина В *Bos taurus* (GenBank: E05472.1). Оптимизация последовательности и химический синтез целевого гена выполнены компанией “Twist Bioscience” (США). Ген был получен в составе вектора pTwist (Amp). Реактивы для питательных сред – фирмы “Sigma-Aldrich” (США).

Конструирование вектора для экспрессии прохимозина. Вектор pPICZalphaA (“Thermo Fisher Scientific”, США) был использован для получения секретируемого прохимозина В. Вектор содержал

промотор AOX1 и фактор внеклеточной селекции *Saccharomyces cerevisiae* [10]. Ген прохимозина В и экспрессионный вектор pPICZalphaA были поочередно обработаны эндонуклеазами рестрикции EcoRI и NotI (“Thermo Fisher Scientific”, США), после чего лигированы по образовавшимся “липким” концам лигазой фага T4 (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Трансформация *P. pastoris*. Вектор pPICZalphaA с встроенным геном прохимозина В был предварительно линейаризован по сайту рестрикции *SacI*. Для создания экспрессионного штамма использовали клетки *K. phaffii* штамма X-33 (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Приготовление электрокомпетентных клеток осуществляли согласно протоколу трансформации (http://tools.thermofisher.com/content/sfs-manuals/easysselect_man.pdf). После электропорации клетки инкубировали 1 ч при 30°C в 1.0 мл 1.0 М сорбитола и высевали на чашки с агаризованной средой, следующего состава (%): дрожжевой экстракт – 1.0, пептон – 2.0, глюкоза – 2.0 и 1.0 М сорбитол, а также различные концентрации зеопина (200, 500, 750, 1000 мкг/мл).

Селекция трансформантов. Отобранные трансформанты штамма *K. phaffii* X-33, устойчивые к зеопину, анализировали на наличие вставки гена *Chum1* методом ПЦР-скрининга с олигонуклеотидами Хим1 5'-GAATTCGCTGAAAT-TACTAGAATCCCATTG-3' и Хим2 5'-GCGGCCGCT-TAAATAGCTTTAGC-3' (“Евроген”, Россия). По результатам селекции и ПЦР-скрининга были отобраны клоны с встроенным геном прохимозина В.

Культивирование трансформантов. Для получения инокулята трансформированные клетки выращивали в течение 24 ч при 30°C в шейкере-инкубаторе “Innova 43R”, (“New Brunswick Scientific”, США) при 250 об./мин в жидкой питательной среде YPD (%), дрожжевой экстракт – 1.0, триптон – 1.5, глюкоза – 1.0), как описано ранее [4]. Полученным инокулятом засеивали пробирки со средой YPD (5 мл) в соотношении 1 : 10, и выращивали при 30°C и 250 об./мин в течение 96 ч. Через каждые 24 ч культивирования добавляли 1.0% метанола. После окончания культивации определяли активность ферментов в культуральной жидкости.

Определение активности химозина в культуральной жидкости. Для активации химозина из культуральной жидкости (КЖ) каждого выбранного клона после культивирования отбирали по 1 мл, добавляли 100 мкл 1.0 М HCl, инкубировали 2 ч, а затем восстанавливали pH до 5.5 добавлением 90 мкл 1.0 М NaOH с последующей инкубацией в течение 2 ч. Активность химозина определяли в соответствии с ранее разработанной методикой определения молоко-свертывающей

активности [11]. Сухое обезжиренное молоко (“Промакс”, Россия) было восстановлено в виде 26%-ного раствора с добавлением 0.5 г/л CaCl₂, pH 6.5. Молоко перемешивали при 25°C в течение 30 мин и инкубировали при 37°C 20 мин. К 1 мл восстановленного обезжиренного молока, содержащего 0.1 г/мл хлорида кальция добавляли 100 мкл КЖ после активации химозина. Определяли время образования сгустка при 37°C. В качестве положительного контроля использовали контрольный раствор с известной активностью химозина (“Proquiga”, Испания) 600 IMCU/мл (IMCU – International milk clotting units, международные единицы свертываемости молока, ГОСТ 11815-2015).

ДСН-электрофорез белков. Электрофоретический анализ белков осуществляли в денатурирующем полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) по Лэммли [12]. В качестве маркеров молекулярного веса использовали FastRuler Middle Range DNA Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США). Концентрацию химозина определяли денситометрическим методом.

Культивирование штамма – продуцента прохимозина в ферментере. Для культивирования штамма-продуцента прохимозина использовался ферментер “Biostat В+” (“Sartorius”, Германия) объемом 2 л. Для получения посевной культуры штамм-продуцент выращивали в течение 1 сут в шейкере-инкубаторе при 30°C и 250 об./мин на среде VMGY, следующего состава (%): дрожжевой экстракт – 1.0, глицерин – 1.0, пептон – 2.0, дрожжевых азотистых оснований – 1.34, 100 мМ калий-фосфатный буфер, pH 6.0. Засев ферментера осуществляли из 1 колбы (150 мл среды), культивирование проводили на минеральной среде с глицерином, следующего состава (г/л): глицерин – 70, KH₂PO₄ – 9.9, (NH₄)₂SO₄ – 15.7, г/л MgSO₄ – 4.6, CaCl₂ – 0.35, биотин – 4.0, PTM1 – 0.972%, пеногаситель Софэксил (“Софэкс-Силикон”, Россия) – 0.1%, при 30°C. После добавления метанола температуру снижали до 26°C. При выращивании на среде с глицерином поддерживали pH среды 4.0, после индукции метанолом значение pH меняли на 5.5. Сорбитол (2.0%) добавляли одновременно с индукцией метанолом через 24 и 48 ч. Добавление метанола осуществляли раз в три часа до его содержания в среде 1.0%. Для этого использовали 50%-ный раствор метанола с 2.2%-ным PTM1. Автоматическое поддержание значения pH среды осуществляли титрованием 10%-ными растворами NH₄OH и H₂SO₄.

Очистка и получение химозина. Для очистки рекомбинантного химозина использовали сочетание методов ионообменной хроматографии с методами хроматографии гидрофобных взаимодействий. На первом этапе культуральную жидкость отделяли от клеток центрифугированием при

16000 g 15 мин при 4°C. После этого культуральную жидкость разбавляли в отношении 1 : 3 50 мМ фосфатным буфером, pH 5.5, и наносили на колонку с DEAE-Sepharose (“GE Healthcare”, США), предварительно уравновешенную 50 мМ фосфатным буфером, pH 5.5. Элюцию проводили 0.3 М NaCl. К полученным активным фракциям добавляли 5 М NaCl до концентрации 2.0 М NaCl. Полученный раствор наносили на колонку с Phenyl-Sepharose (“GE Healthcare”, США), предварительно уравновешенную 2 М NaCl в 50 мМ Na₂HPO₄, pH 5.5. Элюцию проводили 50 мМ Na₂HPO₄, pH 5.5. Полученные фракции объединяли и анализировали ДСН-ПААГ-электрофорезом.

Статистическая обработка результатов. Данные по ферментативной активности были измерены в 5 повторностях. Статистическая обработка проведена в “Origin 2015” (OriginLab Corporation, США). Для количественных переменных результаты представлены в виде среднего арифметического (\bar{M}) с указанием среднеквадратического отклонения ($\pm SD$), на графиках указан 95% доверительный интервал (CI).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Селекция трансформантов *K. phaffii*. Отобранные после трансформации клоны, несущие ген прохимозина В, названные pPICZ α -Chym1, проанализировали ПЦР-скринингом на наличие вставки. Результаты представлены на рис. 1. Клоны pPICZ α -Chym1 проверяли на возможность проявлять молокосвертывающую активность. Более 75% клонов проявляли ферментативную активность в диапазоне 0.1–5 ИМСУ/мл (рис. 2). Клоны с наибольшей активностью химозина были получены при концентрации зеоцина 750 мкг/мл.

Динамика экспрессии химозина. Для подбора оптимальных условий культивирования в колбах были отобраны 6 клонов с максимальной активностью химозина. При культивировании в колбах (250 об./мин, 30°C) в течении 96 ч при добавлении 50%-ного раствора метанола до конечной концентрации метанола в культуральной среде 1.0% ферментативная активность была на уровне 12.5 ИМСУ/мл. Индукция в среде ВММУ (см. “Методику”) с добавлением 1.0% аскорбиновой кислоты не меняла активность конечного препарата. Однако, добавление 2.0 г/л сорбитола в среду ВММУ с одним из выбранных клонов повышало активность конечного препарата до 20 ИМСУ/мл. Отобранный клон в дальнейшем использовался для оптимизации культивирования в ферментере.

Культивирование дрожжей *K. phaffii* в ферментере. Дрожжи выращивали в ферментере до OD₆₀₀, равной 285. При этом OD₆₀₀ после индукции метанолом значительно не менялась. Для повышения

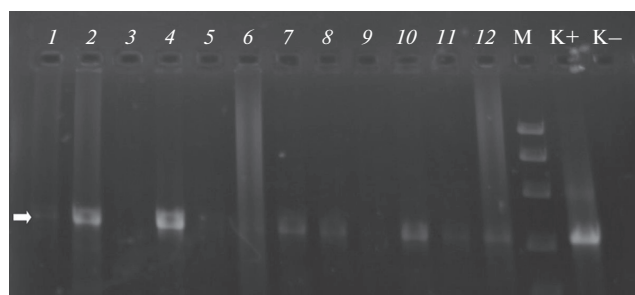


Рис. 1. Результат ПЦР-скрининга клонов *K. phaffii* после трансформации. М – маркеры молекулярной массы, 1–12 – клоны после трансформации конструкцией pPICZ α -Chym1; K+ – положительный и K– – отрицательный контроль ПЦР. Стрелка указывает положение фрагмента ДНК химозина.

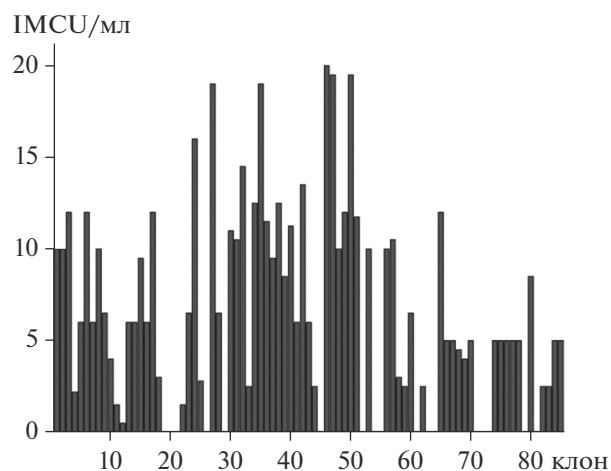


Рис. 2. Молокосвертывающая активность химозина в КЖ клонов *K. phaffii*, выращенных на среде YPD, содержащей зеоцин, при индукции 1%-ным метанолом в течении 72 ч. Клоны 1–10 – 200 мкг/мл зеоцина; клоны 11–20 – 500 мкг/мл зеоцина; клоны 21–60 – 750 мкг/мл зеоцина; клоны 61–85 – 1000 мкг/мл зеоцина.

выхода конечного продукта были протестированы различные режимы ферментации и варианты добавок к основной среде. Максимальный выход продукта (80 мг/л) наблюдался при ферментации pPICZ α -Chym1 в течении 96 ч с двукратным добавлением раствора сорбитола 2.0 г/л через 24 и 48 ч (рис. 3). Полученный выход целевого продукта по уровню экспрессии соответствовал аналогичным разработкам [8]. Добавки сорбитола – одна из стратегий повышения уровня экспрессии при использовании AOX1 промотора [13]. Такая стратегия характерна прежде всего для штаммов-продуцентов с мультикопийной вставкой гена целевого продукта. Оптимизация соотношения метанол/сорбитол позволила добиться в целом более высокого уровня продукции химозина за счет

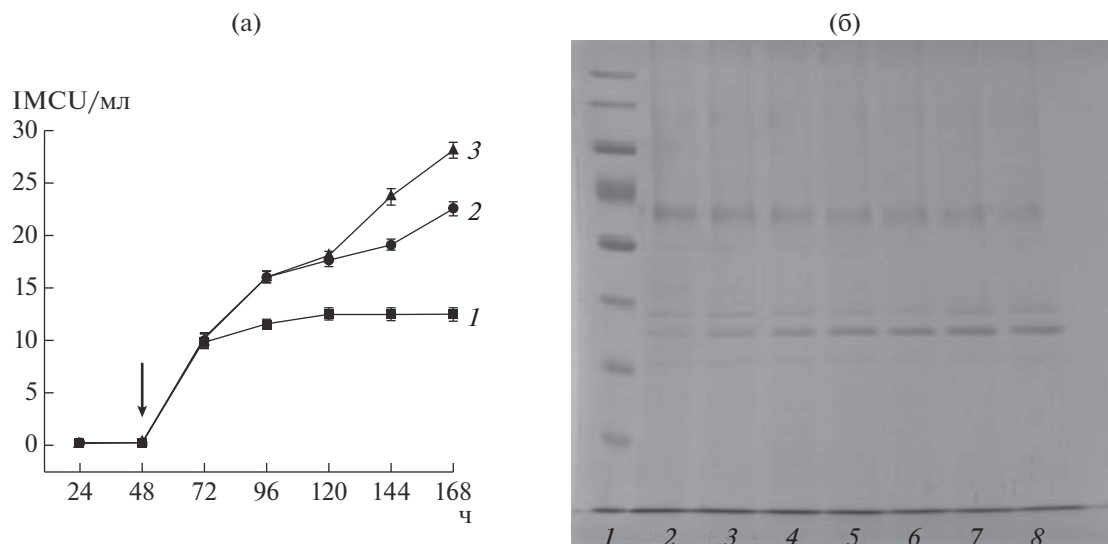


Рис. 3. Биосинтез химозина рPIC α -Chym1 в биореакторе (а) и электрофореграмма КЖ в процессе роста культуры (б). а: 1 – минеральная среда, 2 – та же среда с двукратным добавлением сорбитола по 1.0 г/л, 3 – та же среда с двукратным добавлением сорбитола 2 г/л; стрелкой показано остановка подпитки сорбитолом и начало индукции. б: 1 – маркеры молекулярной массы, 2–8 – 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 ч от начала добавления смеси метанол/сорбитол соответственно; стрелкой обозначена полоса, соответствующая зрелой форме химозина.

улучшения углеводного метаболизма и увеличения биомассы.

Очистка рекомбинантного химозина. Полученную после ферментации КЖ отделяли от клеточной массы центрифугированием и проводили рН-зависимую активацию химозина. Для этого к 400 мл КЖ добавляли 40 мл 1.0 М HCl до значения рН 2.0. При низких значениях рН происходила автокаталитическая активация прохимозина до химозина в результате отщепления N-концевого пептида из 42 аминокислотных остатков. После 2 ч инкубации рН восстанавливали до значения 5.5 добавлением 40 мл 1.0 М NaOH.

Химозин выделяли из КЖ на первом этапе методом анионообменной хроматографии на DEAE-Sepharose. Были подобраны оптимальные условия разбавления в соотношении 1 : 3 КЖ : 50 мМ фосфатный буфер, рН 5.5, при котором удавалось до-

биться максимального связывания химозина с хроматографическим сорбентом с последующей его элюцией. В результате проведенной анионообменной хроматографии раствор химозина удалось сконцентрировать в 5 раз и удалить при этом большинство примесей.

Для следующего этапа очистки использовали хроматографическую колонку с Phenyl-Sepharose объемом 5 мл. К раствору химозина добавляли 5.0 М раствор NaCl до конечной 2.0 М концентрации соли. Хроматографическую колонку Phenyl-Sepharose предварительно уравнивали 50 мМ раствором Na₂HPO₄, рН 5.5, с 2.0 М NaCl. После проведения элюции получали раствор химозина, очищенный в 28 раз, содержащий 85–90% активного белка (табл. 1.). Результаты хроматографической очистки приведены на рис. 4. Суммарные потери по белку на всех этапах активации,

Таблица 1. Стадии выделения и очистки химозина

Стадии очистки	Общее количество химозина, мг	Активность химозина, IMCU/мл	Удельная активность химозина, IMCU/мг белка	Выход химозина по белку, %	Чистота препарата по белку, %
Супернатант КЖ	44	5	7.8	100	30
Супернатант после активации	43.1	42 ± 5	66	95	32
Анион-обменная хроматография	34.5	264 ± 10	152	72	60
Хроматография гидрофобных взаимодействий	31.5	1009 ± 12	220	62	85–90

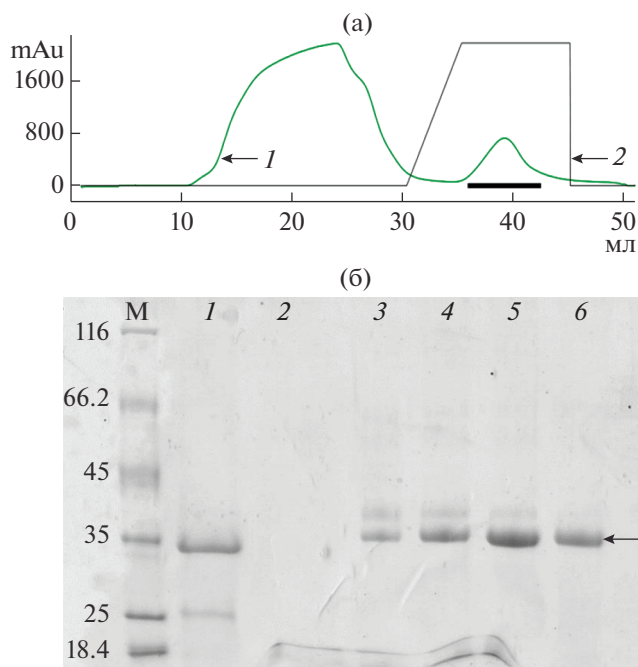


Рис. 4. Очистка рекомбинантного химозина методом хроматографии гидрофобных взаимодействий (а), электрофореграмма фракций (б). а: 1 – OD_{280} , 2 – градиент NaCl; б: М – маркеры молекулярной массы, кДа. 1 – фракция после очистки на DEAE-Sepharose, 2 – не адсорбированная фракция, 3–6 объединенные фракции (36–42 мл). Стрелкой указана полоса, соответствующая зрелой форме химозина.

выделения и очистки составили 38% (табл. 1). Конечный образец удалось сконцентрировать в 44 раза, при этом удельная активность полученного химозина составила 220 ИМСУ/мг.

Полученный рекомбинантный химозин быка обладал физико-химическими свойствами, сопоставимыми с природным химозином и ранее полученными рекомбинантными аналогами химозина быка в *K. phaffii* [8]. При этом рекомбинантный химозин проявлял максимальную активность в диапазоне температур 30–38°C при pH 5.5–5.8. Хранение очищенного фермента при температуре 4°C 30 сут приводило к незначительной потере активности. Хранение при температуре 20°C 30 сут приводило к потере 30% активности.

Использование системы экспрессии *K. phaffii* под контролем промотора АОХ1, индуцируемого метанолом, активно применяется в различных технологических процессах, связанных получением ферментов для промышленности [4]. Тем не менее, в будущем возможно создание штаммов-продуцентов рекомбинантного химозина в системе экспрессии *K. phaffii* с использованием возможно более “сильного” промотора, не требующего использования метанола в качестве индуктора. Разработка таких штаммов является основой будущих разработок.

В ходе выполнения работы был получен высокоэффективный рекомбинантный штамм метилотрофных дрожжей *K. phaffii*, продуцирующий функционально активный рекомбинантный прохимозин и подобраны условия автокаталитической активации прохимозина до химозина. Для рекомбинантного химозина разработан метод очистки и концентрирования до 4 мг/мл (1000 ИМСУ/мл).

При проведении исследований использовали оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках выполнения работ по соглашению от 26.11.2018 г. № 14.607.21.0207 (УИН RFMEFI60718X0207), ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бельская С.В., Балабова Д.В., Белов А.Н., Коваль А.Д., Щербаков Д.Н., Ельчанинов В.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 4. С. 315–326.
2. Bodie E.A., Armstrong G.L., Dunn-Coleman N.S. // Enzyme Microb. Technol. 1994. V. 16. № 5. P. 376–382.
3. Van den Berg J.A., van der Laken K.J., van Ooyen A.J., Renniers T.C., Rietveld K., Schaap A., Brake A.J., Bishop R.J., Schultz K., Moyer D. // Nat. Biotechnol. 1990. V. 8. № 2. P. 135–139.
4. Филькин С.Ю., Чертова Н.В., Зенин В.А., Липкин А.В., Садыхов Э.Г., Фёдоров А.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 6. С. 578–585.
5. Filkin S.Y., Chertova, N.V. Zenin V.A., Lipkin A.V., Sichev A.A., Bityak D.S., Sadykhov E.G., Popov V.O., Fedorov A.N. // Prep. Biochem. Biotech. 2020. V. 50. № 6. P. 549–555.
6. Noseda D.G., Recúpero M.N., Blasco M., Ortiz G.E., Galvagno M.A. // Protein Expr. Purif. 2013. V. 92. № 2. P. 235–244.
7. Noseda D.G., Blasco M., Recúpero M., Galvagno M.Á. // Protein Expr. Purif. 2014. V. 104. P. 85–91.
8. Noseda D.G., Recúpero M., Blasco M., Bozzo J., Galvagno M.Á. // Protein Expr. Purif. 2016. V. 123. P. 112–121.
9. Peña D.A., Gasser B., Zanghellini J., Steiger M.G., Mattanovich D. // Metab. Eng. 2018. V. 50. P. 2–15.
10. Higgins D.R., Busser K., Comiskey J., Whittier P.S., Purcell T.J., Hoeffler J.P. // Methods Mol. Biol. 1998. V. 103. P. 41–53.
11. Dunn-Coleman N.S., Bloebaum P., Berka R.M., Bodie E., Robinson N., Armstrong G., Ward M., Przetak M., Carter G.L., LaCost R. // Nat. Biotechnol. 1991. V. 9. № 10. P. 976–981.
12. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
13. Niu H., Jost L., Pirlot N., Sassi H., Daukandt M., Rodriguez C., Fickers P. // Microb. Cell Factories. 2013. V. 12. №. 33.

Optimization of Production Method for Recombinant Chymosin in Methylotrophic Yeast *Komagataella phaffii*

S. Y. Filkin^a, N. V. Chertova^a, E. A. Vavilova^a, S. S. Zatsepin^a, M. A. Eldarov^b,
E. G. Sadykhov^a, A. N. Fedorov^a, and A. V. Lipkin^{a, *}

^a*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

^b*Institute of Bioengineering, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia*

*e-mail: lipus57@yahoo.com

An effective recombinant strain of *Komagataella phaffii* for *Bos taurus* prochymosin production was obtained. A method for the isolation and purification of recombinant chymosin has been developed, which includes two-stage purification by ion exchange and hydrophobic chromatography. A highly purified (~90%) recombinant chymosin with a concentration of 4 mg/ml (1000 IMCU/ml) was obtained with a yield of 62%. The developed method can be used for the industrial application.

Keywords: chymosin, methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, *Komagataella phaffii*