



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/11 (2020.02); C12N 15/81 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019140913, 11.12.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.12.2019

Дата регистрации:
28.07.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.12.2019

(45) Опубликовано: 28.07.2020 Бюл. № 22

Адрес для переписки:

117545, Москва, 1-ый Дорожный пр-д, 1, НИЦ
"Курчатовский институт"-ГосНИИгенетика

(72) Автор(ы):

Калинина Анна Николаевна (RU),
Борщевская Лариса Николаевна (RU),
Гордеева Татьяна Леонидовна (RU),
Синеокий Сергей Павлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Государственный
научно-исследовательский институт
генетики и селекции промышленных
микроорганизмов Национального
исследовательского центра "Курчатовский
институт" (НИЦ "Курчатовский
институт"-ГосНИИгенетика) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: CN 104130951 A, 05.11.2014. RU
2701642 C1, 30.09.2019. EA 17803 B1, 29.03.2013.

(54) Трансформант дрожжей *Pichia pastoris*, продуцирующий эндо-1,4-β-ксиланазу из *Paenibacillus brasiliensis*

(57) Реферат:

Изобретение относится к микробиологии и биотехнологии и касается получения рекомбинантных штаммов дрожжей *Pichia pastoris*, способных продуцировать эндо-1,4-β-ксиланазу. Получен трансформант дрожжей *Pichia pastoris* - продуцент ксиланазы, несущий в составе

хромосомы ген, кодирующий эндо-1,4-β-ксиланазу, из *Paenibacillus brasiliensis*, и дополнительные копии гена НАС1 из *Pichia pastoris*. Изобретение позволяет расширить ассортимент высокоэффективных продуцентов ксиланаз. 2 ил, 3 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 15/11 (2020.02); C12N 15/81 (2020.02)(21)(22) Application: **2019140913, 11.12.2019**(24) Effective date for property rights:
11.12.2019Registration date:
28.07.2020

Priority:

(22) Date of filing: **11.12.2019**(45) Date of publication: **28.07.2020 Bull. № 22**

Mail address:

**117545, Moskva, 1-yj Dorozhnyj pr-d, 1, NITS
"Kurchatovskij institut"-GosNIIgenetika**

(72) Inventor(s):

**Kalinina Anna Nikolaevna (RU),
Borshchevskaya Larisa Nikolaevna (RU),
Gordeeva Tatyana Leonidovna (RU),
Sineokij Sergej Pavlovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
uchrezhdenie "Gosudarstvennyj
nauchno-issledovatel'skij institut genetiki i
selekcii promyshlennykh mikroorganizmov
Natsionalnogo issledovatel'skogo tsentra
"Kurchatovskij institut" (NITS "Kurchatovskij
institut"-GosNIIgenetika) (RU)**(54) **TRANSFORMANT OF PICHIA PASTORIS YEAST, PRODUCING ENDO-1,4-B-XYLANASE FROM
PAENIBACILLUS BRASILENSIS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to microbiology and biotechnology and relates to production of recombinant strains of yeast *Pichia pastoris* capable of producing endo-1,4- β -xylanase. A transformant of yeast *Pichia pastoris* – a xylanase producer, which containsa gene encoding endo-1,4- β -xylanase from *Paenibacillus brasilensis*, and additional copies of the NAS1 gene from *Pichia pastoris*.

EFFECT: invention allows to expand the range of high-efficiency xylanase producers.

1 cl, 2 dwg, 3 ex

RU 2 728 033 C1

RU 2 728 033 C1

Изобретение относится к микробиологии и биотехнологии и касается получения трансформантов дрожжей *Pichia pastoris*, способных продуцировать ксиланазу.

Ксилан является основным структурным полисахаридом растительных клеток и вторым после целлюлозы наиболее распространенным полисахаридом в природе [Biotech. Genet. Eng. Rev. 1995, 13, 100-131]. Это комплексный полисахарид, основная цепь которого состоит из β -(1-4) связанного ксилозного скелета с небольшим количеством β -(1-3) ответвлений [Macromol Rapid Commun., 2000, 21(9), 542-556. doi: 10.1002/1521-3927(20000601)21:9<542::AID-MARC542>3.0.CO;2-7].

Полная деградация ксилана требует комплекса ксиланолитических ферментов, включающих эндо-ксиланазу, ксилозидазу, глюкуронидазу, ацетилэстеразу и арабинофуранозидазу [Crit Rev Biotechnol., 2002, 22, 33-64, doi: 10.1080/07388550290789450].

Основную роль в разрушении ксилана играет эндо-ксиланаза (эндо-1,4- β -ксиланаза, ЕС 3.2.1.8), которая катализирует случайный гидролиз ксилана до ксилололигосахаридов.

Эндо-1,4- β -ксиланазу широко используют в различных отраслях промышленности. При кормопроизводстве введение ксиланаз уменьшает содержание некрахмальных полисахаридов, тем самым снижая вязкость корма в кишечнике животных и улучшая усвояемость и питательную ценность плохо разлагаемых кормов. [J. Anim. Sci., 2002, 80, 2773-2779; Br. Poult. Sci., 2003, 44, 60-66; Br. Poult. Sci., 2003, 44, 291-298]

Природными источниками ксиланаз являются различные микроорганизмы: бактерии, грибы, дрожжи и актиномицеты [FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29 (1), 3-23].

Традиционно ферментные препараты, в состав которых входят ксиланазы, получают на основе нерекомбинантных или рекомбинантных штаммов грибов рода *Trichoderma*, *Aspergillus* или *Penicillium*. Однако грибные штаммы, помимо ксиланазы, продуцируют ряд других ферментов, относящихся к карбогидразам, а именно: целлюлазу, глюканазу, пектиназу и маннаназу, что не позволяет использовать их при производстве моноферментных препаратов.

Наиболее перспективным является создание продуцентов ферментов на основе рекомбинантных штаммов метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. При использовании несбраживаемых источников углерода (глицерина, метанола и т.п.) дрожжи *Pichia pastoris* способны к росту с образованием биомассы высокой плотности, что позволяет получать значительные количества гетерологичного белка [Appl. Microbiol. Biotechnol., 2000, 54(6), 741-750]. При этом процесс культивирования метилотрофных дрожжей достаточно прост, поскольку их рост не блокируется продуктами метаболизма [FEMS Microbiol. Rev., 2000, 24: 45-66, doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x].

Известны примеры создания продуцентов ксиланазы на основе дрожжей *Pichia pastoris*.

Показано [Protein Expression and Purification 57 (2008), 101-107], что ген *reBlxA* из *Bacillus licheniformis*, кодирующий ксиланазу А, эффективно экспрессируется в клетках дрожжей *Pichia pastoris*, при этом активность рекомбинантной ксиланазы в культуральной жидкости составляет 122.9 U/mg.

Известны также рекомбинантные штаммы *Pichia pastoris*, продуцирующие ксиланазу из *Streptomyces* sp. FA1 [CN 107142225 A] и ксиланазу из *Neocallimastix frontalis* [CN 104130951 A].

В работе [Биотехнология, 2018, 34 (6), 22-32], что эндо-1,4- β -ксиланаза из *Paenibacillus brasilensis* обладает промышленно ценными свойствами. На основе *P. pastoris* получены штаммы, секретирующие ксиланазу из *Paenibacillus brasilensis*, продуктивность которых

при культивировании в пробирках составляет 1114 и 1728 ед/мл культуральной жидкости [RU 2701308, RU 2701642].

Однако, остается потребность в расширении арсенала штаммов *P. pastoris* с повышенной продукцией эндо-1,4- β -ксилаказы из *Paenibacillus brasiliensis*.

5 Одним из подходов, позволяющих повысить продукцию целевых белков в *P. pastoris*, является коэкспрессия генов-помощников, входящих в систему ответа клетки на несвернутый белок (UPR - unfolded protein response) [Экологическая генетика, 2017, 15 (2), 21-30]. В качестве таких генов используют, в частности, ген, кодирующий протеиндисульфидизомеразу (Pdi), которая выступает в качестве шаперона, ингибируя
10 агрегацию неправильно свернутых белков; ген HAC1, кодирующий активатор транскрипции генов UPR и другие. Так, в работе [Journal of proteomics, 91 (2013) 58-72] в состав хромосомы рекомбинантного штамма *P. pastoris*, продуцирующего ксиланазу из *Bacillus halodurans*, был интегрирован ген HAC1 из *P. pastoris*, что привело к увеличению продуктивности на 38% по сравнению с исходным штаммом.

15 Однако, суперэкспрессия гена HAC1 в *P. pastoris* может не только увеличивать продукцию некоторых гетерологичных ферментов, но и снижать, а также не оказывать никакого эффекта [Microb. Cell Factories, 2010, 9, 49].

Таким образом, суперэкспрессия гена HAC1 по-разному влияет на продукцию различных ферментов, и, при существующем состоянии знаний в данной области,
20 вспомогательные (хелперные) функции гена HAC1, а также других генов-помощников, не могут быть предсказаны даже в случае доступности последовательности ДНК всего генома организма-хозяина [EA017803].

Сведений о влиянии суперэкспрессии гена HAC1 из *P. pastoris* на продукцию клетками *P. pastoris* ксиланазы из *Paenibacillus brasiliensis* нами не выявлено.

25 Задачей заявляемого изобретения является расширение арсенала рекомбинантных микроорганизмов, продуцирующих эндо-1,4- β -ксилаказу.

Задача решена путем получения трансформанта дрожжей *P. pastoris*, продуцирующего ксиланазу, несущего в составе хромосомы ген *hxl*, кодирующий эндо-1,4- β -ксилаказу из *Paenibacillus brasiliensis*, и дополнительные копии гена HAC1 из *P. pastoris*.

30 Получение заявляемого трансформанта заключается в совместной экспрессии гена *hxl*, кодирующего эндо-1,4- β -ксилаказу из *Paenibacillus brasiliensis* [MK014302 GenBank] и дополнительных копий гена HAC1 из *P. pastoris*, кодирующего активатор транскрипции генов UPR [XM_002489994.1 GenBank].

Трансформация гена *hxl* в клетки дрожжей *P. pastoris* осуществляется с помощью
35 экспрессионной кассеты, включающей целевой ген, промотор, работающий в дрожжах *P. pastoris*, сигнальный пептид для осуществления секреции фермента в культуральную жидкость, терминатор, маркерный ген и, предпочтительно, сайт для гомологичной интеграции в хромосому. Интеграцию осуществляют путем как гомологичной, так и негомологичной рекомбинации.

40 Трансформацию дополнительных копий гена HAC1 в клетки дрожжей *P. pastoris* осуществляют с помощью экспрессионной кассеты, включающей целевой ген, промотор, работающий в дрожжах *P. pastoris*, терминатор, маркерный ген и, предпочтительно, сайт для гомологичной интеграции в хромосому. Интеграцию осуществляют путем как гомологичной, так и негомологичной рекомбинации.

45 Трансформация указанных генов может быть осуществлена в любой последовательности, любым подходящим методом, в частности, методом электропорации [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf] или методом с использованием полиэтиленгликоля или протопластов [<http://www.thermofisher.com/>]

order/catalog/product/K173001].

Получение заявляемого трансформанта может быть осуществлено также трансформацией в клетки штамма дрожжей *P. pastoris*, являющегося продуцентом эндо-1,4- β -ксилазы из *Paenibacillus brasilensis*, дополнительных копий гена HACS1 из *P. pastoris*.

Конструирование экспрессионных кассет осуществляют стандартными методами генетической инженерии [Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии. - СПб.: СПбГТУ, 1999, Sambrook J., Maniatis T., Fritsch E. Molecular cloning: a laboratory manual. - N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989] с использованием генетических элементов, подходящих для работы с дрожжами *Pichia pastoris*. В качестве промоторов могут быть использованы AOX1, DAS, FLD1, ICL1, PHO89, THI11, ADH1, ENO1, GUT1, GAP, TEF1, PGK1, GCW14, G1, G6 или другие [Appl Microbiol Biotechnol (2014) 98: 5301-5317]. В качестве сигнальных пептидов используют α -фактор, PHO1, SUC2, PHA-E, KILM1, pGKL, CLY, CLY-L8, K28 pre-pro-toxin или другие [Appl Microbiol Biotechnol (2014) 98: 5301-5317]. В качестве селективных маркеров используют любые подходящие маркеры, например, гены резистентности к антибиотикам зеоцину, генетицину (G418) или бластицидину С, а также гены комплементирующие ауксотрофные мутации в геноме *Pichia pastoris*, например, HIS4, MET2, ADE1, ARG4, URA3, URA5, GUT1 [Yeast 2005; 22: 249-270]. В качестве плечей для гомологичной интеграции используют, например, последовательности генов AOX1, HIS4 [http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V17520] или другие последовательности, гомологичные участкам хромосомы дрожжей *Pichia pastoris*.

Изобретение проиллюстрировано следующими фигурами:

Фиг. 1 Экспрессионная кассета 1

Фиг. 2 Экспрессионная кассета 2

Изобретение подтверждено следующими примерами.

Пример 1. Конструирование трансформанта *P. pastoris*, продуцирующего эндо-1,4- β -ксилазу из *Paenibacillus brasilensis*

При конструировании интегративной кассеты для экспрессии гена *xyl* используют метод "фьюжн-пцр" [Gene., 1989, 15, 77(1), 61-68.]. В качестве источника гена *xyl* используют тотальную геномную ДНК *Paenibacillus brasilensis* X1 ВКПМ В-13092 [Биотехнология, 2018, 34 (6), 22-32]. Синтезируют ДНК гена *xyl* методом ПЦР с использованием праймеров *XylP-f* и *XylP-r*

XylP-f 5'-gcgacagactactggcaaat-3',

XylP-r 5'-ttaccacaccgttacgtaga-3'.

Полученную последовательность ДНК встраивают в состав экспрессионной кассеты 1 (фиг. 1), в состав которой входят следующие генетические элементы:

1. Ген *xyl* *Paenibacillus brasilensis*, встроенный в единую рамку считывания с нуклеотидной последовательностью сигнального пептида α -фактора, под контролем AOX1 промотора;

2. Терминатор транскрипции TTAOX1;

3. Дрожжевой селективный маркер *kan*, фланкированный сайтами *lox 66* и *lox 71*, под контролем дрожжевого TEF промотора и обуславливающий у дрожжей *Pichia pastoris* устойчивость к антибиотику генетицину (G418);

4. Область интеграции - нуклеотидная последовательность гена AOX2.

Указанную интегративную экспрессионную кассету трансформируют в штамм *Pichia pastoris* ВКПМ Y-4392, полученный на основе штамма *Pichia pastoris* DSMZ 70877 интеграцией в хромосому кассеты *Pscip-cre*, состоящей из гена *cre*, кодирующего

рекомбиназу бактериофага P1 под контролем P_{cup} промотора из *Saccharomyces cerevisiae*.

Штамм *Pichia pastoris* ВКПМ Y-4392 предварительно выращивают в жидкой питательной среде YP (мас. %: дрожжевой экстракт - 1, пептон - 2, вода - остальное) с добавлением глюкозы (2 мас. %) до концентрации 1×10^8 клеток на 1 мл. Клетки центрифугируют, промывают в ледяной стерильной воде, а затем в ледяном растворе 1 М сорбитола. Затем клетки инкубируют в 25 мМ растворе дитиотрейтола в течение 15 минут и промывают в ледяном растворе 1 М сорбитола. Обработанные таким образом клетки ресуспендируют в ледяном растворе 1 М сорбитола в концентрации $1 - 5 \times 10^9$ клеток на 1 мл. Аликвоту, объемом 40 мкл клеточной суспензии, переносят в охлажденный эппендорф, добавляют 400 нг ДНК экспрессионной интеграционной кассеты, и инкубируют во льду 5 минут. Смесь клеток и ДНК переносят в предварительно охлажденную кювету для электропорации. Электропорацию проводят при следующих условиях: 1,5 кВ, 400 Ом, 25 μ F. После порации добавляют 1 мл ледяного раствора 1 М сорбитола.

Селекцию трансформантов ведут на агаризованной среде YP (мас. %: дрожжевой экстракт - 1, пептон - 2, агар - 2, вода - остальное) с добавлением глюкозы (2 мас. %) в течение 5 суток при температуре 30°C. В качестве селективного агента добавляют антибиотик G418 в количестве 500 мкг/мл.

Для отбора наиболее продуктивных трансформантов проводят их культивирование в жидкой ферментационной питательной среде YP с добавлением метанола (3 мас. %) в 96-луночных планшетах при 30°C в течение 72 ч на качалке (250 об/мин). В качестве контроля используют штамм *Pichia pastoris* ВКПМ Y-4392.

Определение активности ксиланазы в культуральной жидкости проводят с использованием ДНС метода [Anal. Chem., 1959, 31 (3), 426-428] в 96-луночном планшете следующим образом: в каждой лунке смешивают 25 мкл 1% раствора субстрата ксилана березы в 0,5 М ацетатном буфере (pH 6) и 25 мкл культуральной жидкости. Инкубацию проводят при 50°C 10 минут, после чего добавляют в лунку 50 мкл раствора ДНС. Планшет прогревают при 99°C 10 минут и измеряют оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 546 нм. В качестве стандарта используют раствор глюкозы.

По результатам ферментации отбирают наиболее продуктивный трансформант Xyl66, который при культивировании в планшете синтезирует ксиланазу в количестве 308 ед/мл культуральной жидкости.

Для выщепления маркерного гена kanMX из экспрессионной кассеты, интегрированной в хромосому трансформанта Xyl66, проводят индукцию гена *cre*, кодирующего рекомбиназу бактериофага P1, встроенного в хромосому штамма *Pichia pastoris* Y-4392 (Mut+, INS P_{cup}-*cre*) и находящегося под контролем промотора P_{cup}. Индукция происходит в присутствии ионов меди. Для этого клетки трансформанта №66 выращивают в жидкой питательной среде YP с добавлением глюкозы (2 мас. %) до концентрации 1×10^8 клеток на 1 мл, после чего добавляют раствор сульфата меди до концентрации 0,3 М, инкубируют в течении 3 часов, после чего клетки высевают на агаризованную питательную среду YP с добавлением глюкозы (2 мас. %). Отбирают колонии, не способные к росту в присутствии антибиотика G418.

Таким образом отобран трансформант Xyl66 с выщепленным маркерным геном kanMX, способный к синтезу фермента эндо-1,4- β -ксиланазы *Paenibacillus brasilensis*.

Пример 2 Получение трансформанта, несущего в составе хромосомы дополнительные копии гена НАС из *Pichia pastoris*

При конструировании интегративной кассеты для экспрессии гена НАС1 используют

метод "фьюжн-пцр" [Gene., 1989, 15, 77(1), 61-68.]. В качестве источника гена HАС1 используют тотальную геномную ДНК *Pichia pastoris* ВКПМ Y-4392. Синтезируют ДНК гена HАС1 методом ПЦР с использованием праймеров HАС1-f и HАС1-r.

HАС1-f5'-atgcccgtagattcttctca-3',

HАС1-r5'-ctattctggaagaatacaaaagt-3'

Полученную последовательность ДНК встраивают в состав экспрессионной кассеты 1 (фиг. 2), в состав которой входят следующие генетические элементы:

1. Ген HАС1_ *Pichia pastoris* под контролем GАР промотора;

2. Терминатор транскрипции ТТАОХ1;

3. Дрожжевой селективный маркер *kan*, фланкированный сайтами *lox 66* и *lox 71*, под контролем дрожжевого ТЕФ промотора и обуславливающий у дрожжей *Pichia pastoris* устойчивость к антибиотику генетицину (G418);

Указанную экспрессионную кассету интегрируют в состав хромосомы трансформанта Ху166. Трансформацию экспрессионной кассеты, отбор наиболее активного трансформанта и выщепление маркерного гена проводят как описано выше.

Отобран трансформант Ху166-HАС145, в состав хромосомы которого интегрированы ген *hul* и дополнительные копии гена HАС1 из *Pichia pastoris*, способный к синтезу фермента эндо-1,4-β-ксилазазы *Paenibacillus brasilensis* в количестве 495 ед/мл КЖ при культивировании в планшете.

Пример 3. Получение ксиланазы путем культивирования трансформанта Ху166-HАС145

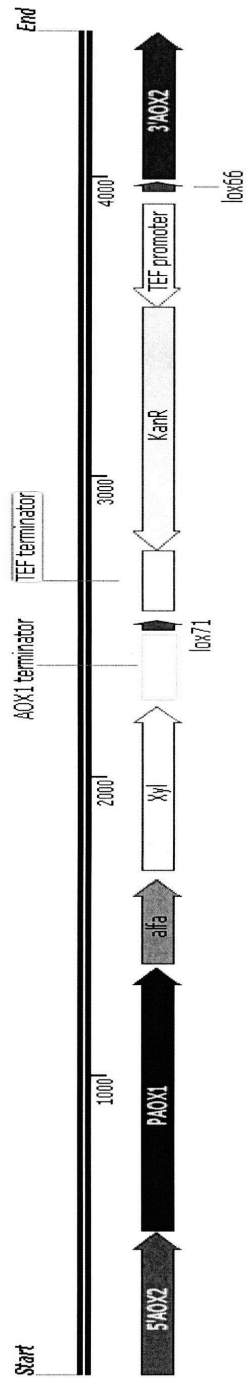
Посевную культуру выращивают в пробирках (50 мл) с 10 мл жидкой питательной среды YPD с добавлением глюкозы (2 мас. %) при 30°C в течение 24 ч на качалке с 250 об/мин. Посев ферментационной среды осуществляют в соотношении 1/10.

Ферментацию проводят при 30°C на качалке (250 об/мин) в питательной среде состава (мас. %): дрожжевой экстракт - 0,5, пептон - 1, вода - остальное с добавлением глюкозы (1 мас. %) в пробирках (50 мл) с рабочим объемом 5 мл. Через 18 часов добавляют метанол (1 мас. %) Ферментацию продолжают в течение 72 часов, добавляя метанол (1 мас. %) через каждые 24 часа. После окончания ферментации определяют количество фермента ксиланазы в культуральной жидкости с использованием ДНС метода [Anal. Chem., 1959, 31 (3), 426-428].

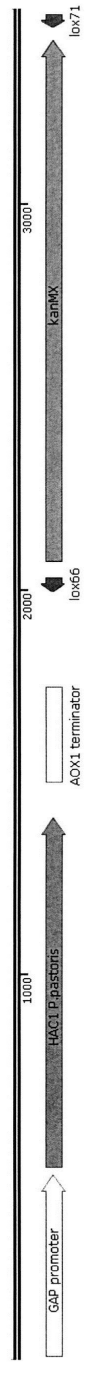
Через 72 часа ферментации количество фермента составило 1780 ед/мл культуральной жидкости.

(57) Формула изобретения

Трансформант дрожжей *Pichia pastoris* - продуцент ксиланазы, несущий в составе хромосомы ген, кодирующий эндо-1,4-β-ксилазазу из *Paenibacillus brasilensis*, и дополнительные копии гена HАС1 из *Pichia pastoris*.



Фиг. 1



Фиг. 2