

УДК 577.112.387.2:602.6

**А.Ю. Просеков, О.О. Бабич, А.С. Солдатова****ОПЫТ КАФЕДРЫ «БИОНАНОТЕХНОЛОГИЯ»  
КЕМЕРОВСКОГО ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА  
ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ  
В ОБЛАСТИ БИОТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ  
РЕКОМБИНАНТНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ\***

Проведен обзор современных методов получения рекомбинантных ферментов для пищевой промышленности. Подобраны оптимальные условия получения рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы *Rhodospiridium toruloides*, выделенной из *Escherichia coli*. Доля целевого белка, полученного после индукции, составила 40 % суммарного белка клетки. Проведена очистка полученного белка на Ni-NTA агарозе. Степень очистки белка составила более 90 %.

Рекомбинантный штамм, фермент, клонирование, генетическая инженерия, конструирование, L-фенилаланин-аммоний-лиаза, трансформация, вектор экспрессии.

**Введение**

Ферменты – это биологические катализаторы белковой природы, способные ускорять химические реакции, протекающие в животном и растительном мире. Достижения современной технологии получения ферментных препаратов значительно расширили возможности применения ферментов в первую очередь в медицине и пищевой промышленности. На сегодняшний день мировой рынок ферментов достаточно стабилен. Главными игроками на нем остаются такие компании, как Novozymes, Danisco, Genzyme, Roche, Allergen, DSM и BASF. Компания Novozymes контролирует 46 % рынка ферментных препаратов. Остальная часть (36 %) поделена между Danisco, Genzyme, Roche, Allergen, DSM и BASF [1].

В последнее десятилетие сохраняют актуальность исследования по применению ферментов для целей промышленности, тонкого органического синтеза, защиты окружающей среды, медицинской и экологической диагностики, пищевой промышленности. По данным ряда аналитических служб, европейский рынок пищевых ферментов постоянно расширяется и наращивает свои объемы, прибавляя ежегодно 8 %, к 2011 году он достиг объема в 846,2 млн евро в денежном выражении [1]. Одно из наиболее успешно развивающихся направлений – ферменты для выпечки. По данным Frost and Sullivan, этот сегмент, занимающий около трети всего рынка пищевых ферментов, за последние пять лет вырос почти на 40 %. К 2010 году объем рынка составил более 53 млн евро [1].

Основная доля в структуре ферментов для пищевой промышленности приходится на гидролазы. Так, на долю  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилаз приходится 15 % объема рынка ферментов для пищевой промышленности, на долю глюкоамилазы – 6 %. Амилаза является основ-

ным ферментом, применяемым в различных секторах пищевой промышленности: как в производстве пива, так и в хлебопечении. Вторым по значимости ферментом является протеаза, на долю которой приходится 14 % от объема рынка. Заметная доля (10 %) приходится на препараты на основе ксиланазы, которые используются преимущественно при производстве спирта и алкогольных напитков. Все большую востребованность в пищевой промышленности приобретают полиферментные композиции – препараты на основе двух и более ферментов, в большинстве случаев из класса гидролаз. В настоящий момент на их долю приходится почти 35 % объема рынка ферментов для пищевой промышленности [2].

Промышленное производство ферментов для пищевой промышленности восходит к 1874 году, когда датский ученый Христиан Хансен получил реннин (химозин) из желудков телят для использования в производстве сыров. В настоящее время химозин получают с использованием микроорганизмов. Для получения ферментных препаратов пищевого назначения используют органы и ткани сельскохозяйственных животных, культурные растения (ананас, соя, папайя, инжир) и специальные штаммы микроорганизмов. В настоящее время наибольшее применение нашли ферменты микробного происхождения (рекомбинантные ферменты). Кроме того, при получении ферментов широко используют инновации, которые построены на таких направлениях, как модификация свойств индустриальных ферментов с целью повышения их активности и удешевления целевых продуктов; скрининг новых микроорганизмов – продуцентов ферментов; получение новых рекомбинантных ферментов с заданными свойствами; разработка пищевых нанотехнологий с использованием ферментов.

\*Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы, государственный контракт № 16.740.11.0239.

Использование технологий рекомбинантной ДНК сделало возможным производство новых ферментов, используемых в процессах пищевых производств. Такие ферменты можно обнаружить путем скрининга микроорганизмов в различных средах с использованием современных методов белковой инженерии и молекулярной эволюции [4]. В результате получены некоторые важные для пищевой промышленности ферменты, такие как амилазы и липазы. Другим важным достижением является оптимизация условий производства штаммов микроорганизмов. Например, недавно разработаны некоторые штаммы микроорганизмов, позволяющие увеличить выход ферментов за счет удаления нативных генов, кодирующих внеклеточные протеазы. Кроме того, некоторые штаммы микроорганизмов были модифицированы с целью снижения образования токсичных метаболитов [4, 5].

Усложнение процессов пищевого производства увеличивает спрос на широкий спектр ферментов с характеристиками, совместимыми с условиями обработки продуктов питания [6]. Например, широко используемые заменители сахара, такие как глюкозный или фруктозный сиропы, как правило, производятся из кукурузного крахмала с использованием гидролитических ферментов. На первом этапе гидролиза крахмала он нагревается с  $\alpha$ -амилазой до 105 °С в течение 2–5 мин, затем 1–2 ч выдерживается при температуре 90–100 °С. С появлением ДНК-технологий стало возможным конструирование амилаз с повышенной термоустойчивостью и улучшенной совместимостью с другими параметрами процесса сжижения. Эти свойства стали возможны благодаря изменениям в аминокислотной последовательности  $\alpha$ -амилазы через модификации в ДНК генов фермента. С использованием ДНК-технологий также были улучшены свойства других ферментов, используемых в пищевой промышленности [6].

### Литературный анализ

Промышленному производству рекомбинантных ферментов предшествуют интенсивные исследования, которые завершаются конструированием ферментов [10]. Этот процесс обычно включает следующие стадии:

- 1) выбор штамма-хозяина;
- 2) конструирование вектора экспрессии;
- 3) трансформация штамма-хозяина;
- 4) обнаружение оптимального рекомбинантного штамма;
- 5) дополнительные исследования и характеристика штамма-продуцента.

Каждая из этих стадий управляется рядом обстоятельств, связанных с идентификацией и свойствами организма-хозяина и доступностью генетических методов для модификации и трансформации [10].

#### 1. Выбор штамма-хозяина

Большинство штаммов, используемых в настоящее время в пищевой промышленности, были выделены из относительно небольшого числа бактери-

альных и грибковых видов: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus niger* или *Aspergillus oryzae*. Эти микроорганизмы имеют долгую историю использования в качестве надежных источников нативных ферментов, а также доказанный эффективный рост в промышленных условиях. Кроме того, они поддаются генетическим манипуляциям и известны своей способностью продуцировать большое количество ферментов в ферментативную среду. Эти характеристики делают их удобными для использования в качестве штаммов для производства большого количества ферментов [11]. Некоторые микроорганизмы, такие как *Escherichia coli* K-12, *Fusarium venenatum* и *Pseudomonas xuorescens*, успешно используются для экспрессии ферментов, используемых в пищевой промышленности [11].

Хотя большинство микроорганизмов, используемых в настоящее время, выделяют фермент в ферментативную среду, грамотрицательные бактерии *E. coli* K-12 (источник химозина) и *P. xuorescens* Biovar I (источник  $\alpha$ -амилазы) скорее накапливают, чем секретируют ферменты. Выделение и очистка синтезированных ферментов обычно включают больше стадий, чем очистка [11]. Штаммы некоторых микроорганизмов образуют множество внеклеточных ферментов. Такие ферменты могут быть включены в состав ферментных препаратов и стимулировать нежелательные процессы в продуктах питания.

***Bacillus subtilis* и ее производные.** Некоторые ферменты, используемые в пищевой промышленности, были недавно получены из рекомбинантных штаммов грамположительных бактерий *B. subtilis* и *B. licheniformis*. *B. subtilis* использовалась в качестве источника таких промышленно важных ферментов, как  $\alpha$ -амилазы и протеазы. Особую важность имеет штамм *B. subtilis* 168, геном которого недавно был секвенирован [12]. Безопасность рекомбинантных ферментов, полученных из *B. subtilis* 168, подтверждена документально.

Другие виды *Bacillus*, в том числе *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* и *B. stearothermophilus*, применяются в качестве источников других ферментов, в основном амилаз. В последнее десятилетие *B. licheniformis* и *B. amyloliquefaciens* успешно применили для экспрессии рекомбинантных энзимов. Определили полные геномные последовательности двух промышленных штаммов *B. licheniformis* и обнаружили гомологию с *B. subtilis*, но отличие от последовательностей *B. cereus* и *B. anthracis*, являющихся патогенами для человека; *B. cereus* образует ряд токсинов, поэтому является ядовитым для пищевой продукции [13].

Безопасность *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* и *B. subtilis* обсуждалась в некоторых обзорах [14]. Pedersen оценил цитотоксичность некоторых промышленных штаммов этих видов [13]. Исследуемые штаммы не взаимодействовали с антителами против энтеротоксинов *B. cereus*.

Безопасность *B. subtilis* и *B. licheniformis* оценивалась Агентством защиты окружающей среды США. *B. subtilis* и подобные виды также использовали для производства ферментов и фармацевтиче-

ских препаратов, антибиотиков, пуриновых оснований и других соединений, имеющих пищевое, медицинское и промышленное применение [13].

Одним из преимуществ использования видов *Bacillus* для масштабного производства ферментов является их способность секретировать ферменты непосредственно в ферментативную среду. Однако производство некоторых нативных внеклеточных протеаз представляет определенные трудности с использованием видов *Bacillus*. Чтобы избежать ферментативной деградации внеклеточными протеазами и увеличить выход фермента, производители ферментов используют мутантные штаммы микроорганизмов [13].

***Escherichia coli* K-12.** В 1990 году сообщалось о ферментном препарате химозине, выделенном из *E. coli* K-12 (21 CFR 184.1685; Flamm). Химозин – это молокосвертывающий фермент, также известный под названием реннин. Штаммы для производства химозина содержат ген бычьего прохимозина. Прохимозин накапливается в клетках *E. coli* K-12 в форме включенных тел. Клетки затем лизируются, и включенные тела выделяются и растворяются. Прохимозин, присутствующий в растворе, очищается и переводится в химозин кислотной обработкой [15].

Безопасность препаратов химозина в первую очередь основана на опубликованных доказательствах того, что *E. coli* K-12 использовалась в качестве лабораторного организма более 30 лет без случаев заражения и поэтому не образует токсинов. *E. coli* K-12 – это одна из наиболее интенсивно изучаемых бактерий. Ее геном был секвенирован в 1997 году. *E. coli* K-12 имеет историю безопасного использования в производстве специальных химических веществ и лекарственных препаратов [15].

***Pseudomonas fluorescens.*** Рекомбинантные штаммы позволяют получать термостабильную  $\alpha$ -амилазу. *Pseudomonas fluorescens* – это грамотрицательная почвенная бактерия, не вызывающая заболеваний человека. Она повсеместно распространена в окружающей среде и, вероятно, накапливается в сырых овощах и фруктах. Геном *P. fluorescens* (штамм Pf-5) был секвенирован в 2005 году [5].

***Aspergillus oryzae* и *Aspergillus niger*** находят широкое применение в производстве ферментов для пищевой промышленности. *A. oryzae* применяют в производстве ферментированных продуктов, в том числе соевых соусов, рисового вина и т.д. *A. niger* широко используется для производства лимонной кислоты [9]. *A. oryzae* и *A. niger* традиционно рассматриваются как нетоксичные и непатогенные, в то время как известно, что оба вида способны к образованию малых количеств токсичных вторичных метаболитов, например, микотоксинов [12].

Технологии трансформаций *A. oryzae* и *A. niger* с использованием ДНК-технологий получили свое развитие в 1980-е годы. Впоследствии оба микроорганизма успешно использовались для экспрессии ферментов. Успех промышленного использования *A. oryzae* и *A. niger* был вызван новыми исследованиями их способности к образованию микотоксинов [9]. Известно, что определенные штаммы *A. oryzae* и *A. niger*, используемые для продуцирования фермен-

тов, способны к образованию микотоксинов или других вторичных метаболитов с разной степенью токсичности. Образование этих веществ обычно происходит при стрессовых условиях и не всегда подвергается контролю при ферментативных процессах. В литературе описаны результаты предварительных исследований, которые можно свести к следующему [12]:

- если возможно, при выборе штаммов используются нетоксичные и непатогенные виды;
- заново выделенные и неохарактеризованные штаммы должны проходить обязательные испытания на способность к образованию токсинов перед использованием;
- если штамм способен к образованию микотоксинов, необходимо осуществлять контрольные меры, чтобы гарантировать допустимый уровень ферментного препарата по токсикологическим показателям.

## 2. Конструирование рекомбинантных штаммов

Гены, кодирующие рекомбинантные ферменты, обычно вводятся в организм-хозяин с использованием векторов экспрессии. Вектор экспрессии – это плазмида ДНК, которая несет кассету экспрессии. Существенными компонентами экспрессии являются промотор, ген, кодирующий желаемый фермент, и терминатор. Промотор и терминатор – это регуляторные последовательности, кодирующие транскрипцию гена, кодирующего фермент. Векторы экспрессии содержат также ДНК, выделенные из бактериальных плазмид. Для конструирования специфических векторов экспрессии обычно используют охарактеризованные, доступные в продаже плазмиды [16].

Плазмида pUB110 была первоначально выделена из *Staphylococcus aureus* [17] и впоследствии секвенирована [18]. Плазмида реплицируется в *B. subtilis* и используется при конструировании векторов экспрессии для производства ферментов в *B. subtilis* и других видах *B. subtilis*. Плазмида несет ген *kanr* (устойчивый к канамицину и неомицину), также известный как ген *neo* или *nptII*, или *ph1*. Плазмида также несет два других гена, один из которых кодирует основной иницирующий белок репликации, который иницирует копирование плазмиды, а другой кодирует белок подвижности, который отвечает за подвижность плазмиды от одного штамма *Bacillus* к другому [19].

Ген подвижности обычно удаляют при конструировании вектора экспрессии во избежание нестабильности вектора. Гены *kanr* и *ph1* обычно являются избирательными маркерами при конструировании векторов трансформации. Однако они не всегда приводят к образованию окончательных векторов экспрессии. Большинство векторов экспрессии содержат либо ген *kanr*, либо *ph1*, однако некоторые векторы экспрессии не содержат ни одного из них [6].

Известны и другие бактериальные плазмиды, которые используются при конструировании векторов экспрессии для получения рекомбинантных ферментов [6]. В некоторых случаях комбинируются фрагменты, полученные из двух или более плазмид.

Большинство векторов экспрессии несут собственные гены селективных маркеров. Однако в ряде случаев конструируют два различных вектора, один из которых несет экспрессию, а другой – ген селективного маркера. В каждом случае штамм-хозяин подвергается трансформации с обоими векторами [6].

Представляющая интерес плазмидная система была разработана для индуцированного производства термостабильной  $\alpha$ -амилазы в грамотрицательной бактерии *Pseudomonas fluorescens* [21]. Вектор экспрессии несет ген  $\alpha$ -амилазы при контроле индуцированного *tac*-промотора. Вспомогательная плазида несет ген *lacI* из *E. coli*. Ген *lacI* кодирует белок-репрессор, который связывается с *tac*-промотором и ингибирует экспрессию  $\alpha$ -амилазы. Только после индуцированного роста клеток достигается продуцирование  $\alpha$ -амилазы, вызванное добавлением в ферментационную среду аналога лактозы изопропилтио- $\beta$ -D-галактопиранозиды, предотвращающего связывание репрессора LacI с *tac*-промотором [21].

Бактериальные векторы экспрессии могут быть сконструированы для введения в хромосомы хозяина или для экстрахромосомной (автономной) репликации. Векторы экспрессии, используемые для производства ферментов в бактериях или грибах, обычно конструируют для введения в геном хозяина. Чаще полный вектор экспрессии вводится в грибковый геном. В альтернативном подходе вектор экспрессии вырезается рестрикционным ферментом и фрагмент вектора, содержащий кассету экспрессии и ген селективного маркера, вводится в организм хозяина [6].

Недавно была разработана технология введения вектора ДНК в мультиплетный локус в геноме хозяина. В зависимости от специфической комбинации хозяина/вектора вектор ДНК, который несет либо кассету экспрессии и ген селективного маркера, либо только кассету экспрессии, используют для трансформации. Сила промотора является определяющей для достижения эффективной экспрессии рассматриваемого фермента. Примеры сильных промоторов, используемых в видах *Bacillus*, включают промоторы *amyL* (*B. licheniformis*  $\alpha$ -амилазы) и *amyM* (*B. stearothermophilus* амилазы) [6].

Выбор технологии, используемой для перевода вектора ДНК в клетки хозяина, зависит от свойств хозяина и природы вектора экспрессии. При производстве ферментов бактериальные клетки трансформируют вектором ДНК с использованием конъюгации, электропорирования или векторной инкубации с протопластами, т.е. клетками, стенки которых были химически удалены. Дрожжи и грибы обычно трансформируют инкубированием ДНК с протопластами.

Большинство векторов экспрессии, используемых в производстве ферментов, содержат один или более генов, которые позволяют проводить селекцию трансформированных генов. Селекция бактериальных трансформантов обычно проводится либо с использованием генов селективных маркеров, устойчивых к антибиотикам, либо путем дополнения хромосомных ауксотрофных мутаций функциональным геном, несущим вектор экспрессии. В некоторых примерах маркеры, устойчивые к антибиотикам,

удаляют на финальных стадиях бактериальной экспрессии. В таких случаях селекция проводится путем скрининга микробиологических колоний по ферментативной активности [19].

Большинство векторов экспрессии, используемых для производства ферментов, содержат ген *kanr*, кодирующий фермент аминогликозид 3-фосфотрансферазу II, известный как APH(3)<sub>II</sub> или NPTII. APH(3)<sub>II</sub> катализирует фосфорилирование канамицина или неомицина и в то же время инактивирует эти антибиотики. APH(3)<sub>II</sub> также часто используется как селективный маркер при разработке растительного метода генной инженерии [19].

Другие селективные маркеры, используемые в производстве ферментов, включают гены *amp<sup>r</sup>* и *tet*. Ген *amp<sup>r</sup>* применяли для селекции трансформантов при конструировании штамма *E. coli* K-12 для получения химозина. Ген *amp<sup>r</sup>* кодирует  $\beta$ -лактамазу, которая катализирует гидролиз антибиотиков пенициллинового ряда, в том числе ампициллин. Гены *tet* и *kanr* использовались в качестве селективных маркеров при конструировании штамма *P. fluorescens* для производства термостабильной  $\alpha$ -амилазы. Ген *tet* отвечает за устойчивость к тетрациклину и кодирует белок, связанный с мембраной, который вытесняет тетрациклин из микробной клетки.

### 3. Источники рекомбинантных ферментов

Рекомбинантные ферменты можно выделить из множества источников, в том числе микроорганизмов, растений и тканей животного происхождения. Они обычно идентифицируются с хорошо известными ферментами с длинной историей использования в пищевой промышленности. Например, химозин, выделенный из рекомбинантных штаммов *E. coli* K-12, *Kluyveromyces marxianus var. lactis* и *A. niger var. awamori* [17].

Большинство рекомбинантных ферментов, используемых в настоящее время в пищевой промышленности, выделены из культивируемых микроорганизмов с известными характеристиками. Однако разработка современных высокоэффективных технологий скрининга облегчает открытие новых ферментов из микроорганизмов окружающей среды. В этой связи ДНК выделяют непосредственно из объектов окружающей среды и используют для создания библиотек экспрессии в *E. coli* или других подходящих видах. Библиотеки экспрессии затем подвергают скринингу, чтобы идентифицировать ферменты с нужными характеристиками. Современные ПЦР-технологии используют для ограничения ДНК, предназначенной для введения в организм хозяина с последовательностью, кодирующей желаемый фермент [17].

Термофильные ферменты с оптимизированными свойствами имеют большое значение в процессах хлебопечения и крахмалперерабатывающей промышленности. Некоторые гены, кодирующие такие ферменты, как термостабильные  $\alpha$ -амилазы и ксиланазы, были выделены из термофильных микроорганизмов. Свойства ферментов также могут быть адаптированы к специфическим условиям с использова-

нием современных генетических манипуляций. Сайт-специфичный мутагенез можно использовать для специфических изменений аминокислотной последовательности фермента. Сайт-специфичный мутагенез наиболее эффективен, когда известна трехмерная структура фермента и обоснованы взаимосвязи между структурой и свойствами фермента [17].

В последние годы был разработан подход для улучшения свойств фермента, известный как молекулярная эволюция. Процесс молекулярной эволюции включает несколько этапов. В первую очередь выбираются один или несколько «родительских» генов. Если выбрано несколько генов, они обычно выделяются из различных источников для обеспечения разнообразия последовательностей. Эти гены впоследствии подвергают мутациям случайным образом с использованием таких методов, как ПЦР-мутагенез, случайный мутагенез или генная перестановка. Библиотека измененных генов затем трансформируется в подходящий организм-хозяин. Клоны подвергаются скринингу с использованием высокоэффективных методов идентификации ферментов. Гены, кодирующие эти ферменты, выделяют, секвенируют и обычно повторяют процесс до тех пор, пока не получится фермент с желаемыми характеристиками [17].

Рекомбинантные штаммы затем можно улучшить с использованием классического мутагенеза. Грибковые векторы экспрессии можно внедрить в геном хозяина в различные локусы и разным количестве копий. Следовательно, трансформация приводит к популяции трансформантов, образующих различные уровни необходимых ферментов. Эти трансформанты впоследствии растут при различных условиях, оцениваются на предмет ферментативной экспрессии и других характеристик. Как только произведенный трансформант идентифицируется, он должен подвергаться мутагенезу с использованием химических мутагенов или ультрафиолетового и радиационного излучения. Впоследствии популяцию подвергают скринингу, чтобы получить фермент с желаемыми свойствами.

#### 4. Ферментация

Микробиологические ферменты, нативные или рекомбинантные, производятся путем контролируемой ферментации продуцируемых штаммов. В большинстве случаев ферментация проводится как непрерывный процесс в крупных аэрированных ферментерах при строго контролируемых параметрах, таких как температура, pH и аэрация. Культура периодически тестируется, чтобы гарантировать отсутствие микробиологических составляющих. Ферментативная среда содержит нутриенты и соединения, ускоряющие ферментативный процесс. Как правило, среда содержит декстрозу, ликер кукурузного экстракта, крахмал, соевые бобы, дрожжевой экстракт, аммоний, мочевины и минералы, такие как фосфаты, хлориды или карбонаты. Другие компоненты могут включать пеногасители, кислоты или щелочи для поддержания pH. Для оптимального

производства среда должна удовлетворять питательным требованиям продуцированного штамма [6].

Большинство рекомбинантных ферментов, производимых на сегодняшний день, выделяются в ферментативную среду. После окончания ферментации ферментативный бульон отделяется от клеточного дебриса с использованием флокуляции или фильтрации. Затем фермент концентрируют с помощью ультрафильтрации и испарения. Фермент, накопленный внутри клетки, отделяется от клеточной массы, растворяется и концентрируется. Концентрированный фермент затем стерилизуется с использованием микробной фильтрации и соединяется с такими соединениями, как сахароза, мальтоза, мальтодекстрин, сорбат калия, бензоат натрия. Для многих применений в пищевой промышленности ферменты можно также гранулировать, таблетировать или иммобилизовать на нерастворимых носителях [6].

#### 5. Очистка ферментного препарата

Ферменты используются в пищевой промышленности в очень малых концентрациях. Количество ферментного препарата, используемого в пищевой промышленности, обычно рассчитывается на основании полных твердых органических частиц. Твердые органические частицы включают как сам фермент, так и другие органические компоненты, которые получают при продуцировании микроорганизма и ферментативном процессе. Ферментный препарат тестируется в соответствии с известной процедурой. Тестируемым материалом обычно является концентрированный фермент [6].

Таким образом, производство ферментных препаратов, выделенных из природных источников, восходит к концу XIX века. Развитие молекулярной генетики и клеточной биологии в последние четыре десятилетия изменило производство ферментов. Это стало возможным благодаря клонированию генов, кодирующих ферменты, и введению их в микроорганизм-хозяин, что хорошо приспособлено к крупномасштабной промышленной ферментации. Выход фермента может быть существенно увеличен благодаря использованию эффективных промоторов и введению мультиплетных копий в фермент-кодирующий ген. Кроме того, стало возможным адаптировать свойства ферментов к условиям пищевых производств, таким как температура и pH. Это было достигнуто путем изменения аминокислотной последовательности ферментов с использованием либо рациональной конструкции, либо молекулярной эволюции.

#### *Безопасность рекомбинантных ферментных препаратов*

Ферменты, используемые в пищевой промышленности, продаются в качестве коммерческих ферментных препаратов (табл. 1). Ферментный препарат, как правило, содержит основной фермент и несколько дополнительных веществ, таких как растворители, консерванты и стабилизаторы [3]. Фермент-

ные препараты могут также содержать другие ферменты и метаболиты из организма-продуцента. Все эти материалы имеют соответствующую степень чистоты [3]. Безопасность ферментов для пищевой промышленности, выделенных из рекомбинантных микроорганизмов, интенсивно обсуждалась в литературе и утверждена в руководящих документах, выданных контролирующими органами и международными организациями, например *ScientiWc Committee for Food* [7]. Ключевым компонентом в оценке безопасности фермента является патогенный и токсический потенциал штамма микроорганизмов [8]. Хотя ни патогенные, ни токсические микроорганизмы не используются в производстве ферментов для пищевой промышленности, они способны к образованию токсичных вторичных метаболитов в условиях ферментации. Некоторые из этих микроорганизмов в настоящее время используются в качестве источников рекомбинантных ферментов [9].

Таблица 1

Ферменты из рекомбинантных микроорганизмов

Микроорганизм-источник	Фермент
<i>A. niger</i>	Фитаза, химозин, липаза
<i>A. oryzae</i>	Эстераза-липаза, аспаргановая протеаза, глюкозооксидаза, лакказа
<i>B. licheniformis</i>	Пектиновая эстераза, фосфолипаза А1, $\alpha$ -амилаза
<i>B. subtilis</i>	Пуллуланаза, $\alpha$ -ацетолактат, декарбоксилаза, $\alpha$ -амилаза
<i>E. coli</i> K-12	Химозин
<i>F. venenatum</i>	Ксиланаза
<i>K. marxianus</i> var. <i>lactis</i>	Химозин
<i>P. xhiorescens</i>	$\alpha$ -амилаза
<i>Trichoderma reesei</i>	Пектиновая липаза

Безопасность производства ферментативных штаммов остается в центре внимания. Концепция развития безопасных штаммов с использованием хорошо изученных непатогенных, нетоксичных штаммов, особенно имеющих историю использования в пищевых производствах, получила свое развитие в пищевой промышленности [22].

Имеющиеся способы улучшения штаммов уже внесли вклад в создание более эффективных и безопасных способов продуцирования ферментов. Эта тенденция будет, несомненно, продолжаться, так же как и знания о генетических подходах микроорганизмов, используемых для продуцирования микроорганизмов и новых генетических подходов.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности» на протяжении последних нескольких лет занимается разработками в области технологий получения рекомбинантных ферментных препаратов. Основные направления исследования отражены в табл. 2.

Таблица 2

Разработки Кемеровского технологического института пищевой промышленности в области технологий получения рекомбинантных ферментов

Ферментный препарат	Классификация фермента	Рекомбинантный штамм-продуцент	Применение
L-фенилаланин-аммоний-лиаза (PAL)	КФ 4.3.1.5	<i>E. coli</i>	Биотрансформация фенилаланина в технологии продуктов питания для больных фенилкетонурией
Кератиназа	КФ 3.4.99.12	<i>B. subtilis</i>	Гидролиз кератинсодержащего сырья
Липаза	КФ 3.1.1.3	<i>Candida antarctica</i>	Гидролиз липидов
Пепсин	КФ 3.4.23.12	<i>Erwinia curitovora</i>	Коагуляция белков молока
Химотрипсин	КФ 3.4.21.1	<i>E. coli</i>	Гидролиз белков молока

В настоящей статье отражены результаты выбора методов получения рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы *Rhodospiridium toruloides*, выделенной из *E. coli*. L-фенилаланин-аммоний-лиаза является весьма востребованным в промышленности ферментом, однако штамм *E. coli* обладает рядом технологических неудобств, связанных с невысокой каталитической активностью и достаточной термостабильностью. Поэтому для получения пригодного для использования в промышленности фермента необходимы исследования, направленные на оптимизацию технологии получения данного фермента. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что рекомбинантная L-фенилаланин-аммоний-лиаза соответствует требованиям руководящих документов, утвержденных международной организацией *ScientiWc Committee for Food*.

#### Объекты и методы исследований

*Синтез гена* осуществлялся по методике [23] на автоматическом секвенаторе ABI3730xl согласно последовательности гена *pal*, выделенного из *R. toruloides*. Синтез осуществляли таким образом, чтобы он на своих концах содержал сайты рестрикции *NcoI* и *HindIII* и был предназначен для амплификации и последующей встройки области гена в полилинкер pET28a.

*Амплификацию гена pal* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Разработку олигонуклеотидных праймеров для амплификации гена проводили с помощью программы OLIGO (версия 3.3) с учетом данных о первичной структуре гена *pal*. В качестве матрицы для амплификации кодирующей области гена *pal* из *R. toruloides* использовали последовательность данного гена из баз данных GenBank (X12702.1). Праймеры содержали на 5'-концах дополнительные последовательности, включающие сайты рестрикции *NcoI* для прямого

праймера и HindIII для обратного, и были предназначены для амплификации и последующей встройки структурной области гена в полилинкер экспрессирующего вектора pET28a по соответствующим сайтам. Обратный праймер был сконструирован таким образом, чтобы полученный ампликон не содержал стоп-кодона и обеспечивалась состыковка рамок считывания гена и последовательности *His<sub>6</sub>*.

ПЦР проводили в 20–50 мкл раствора, приготовленного на основе десятикратного буфера для Taq-полимеразы, который содержал 200 мкМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов, 0,5 мкМ праймеров, 2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 10 нг матрицы, 2 единицы Taq ДНК-полимеразы и 0,1 единицы Pfu ДНК-полимеразы. Температуру отжига олигонуклеотидов рассчитывали по эмпирической формуле  $T_m = 67,5 + 34[\%GC] - 395/n$ , где  $\%GC = (G + C)/n$ ,  $n$  – число нуклеотидов. Анализ продуктов ПЦР проводили электрофорезом в 1%-ном агарозном геле.

Секвенирование проводилось по методу Сэнгера согласно протоколу производителя автоматического секвенатора ABI3730x1 фирмы Applied Biosystems (USA) с использованием наборов для секвенирования BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

Гидролиз ДНК рестриктазами *NcoI* и *HindIII* проводили в буферных растворах при оптимальных условиях инкубационной среды, рекомендуемых для каждого из ферментов фирмами-производителями. Полноту гидролиза контролировали электрофорезом в агарозном геле. Реакционную смесь очищали от продуктов реакции с помощью набора QuickClean.

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля. Образцы ДНК разделяли методом электрофореза в трис-ацетатном буфере в блоке 0,7–0,8%-го агарозного геля (Bio-Rad, США), содержащего 0,3 мкг/мл этидиум бромид, и анализировали по флуоресценции в ультрафиолете при длине волны 254 нм. Участки геля, содержащие интересующие фрагменты, вырезали и переносили в микроцентрифужные пробирки, после чего проводили элюцию фрагментов ДНК с помощью набора «Выделение ДНК из агарозных гелей» фирмы Boehringer Mannheim (Германия). В пробирку добавляли раствор перхлората натрия из расчета 400 мкл на 100 мг веса вырезанного геля. Полученную смесь нагревали до 65 °С, при этом агароза растворялась в солевом буфере. В суспензию вносили стеклянные микрошарики (Glass milk) из расчета 20 мкл на 100 мг веса геля. В солевом растворе ДНК, содержащаяся в геле, адсорбировалась на поверхности этих шариков. Далее шарики промывали (последовательное осаждение – ресуспендирование) один раз тем же солевым раствором и два раза 70%-ным этанолом. Десорбировали ДНК с шариков путем ресуспендирования в буфере TE (10 мМ Трис-HCl-буфер, pH 7,4; 1 мМ ЭДТА) из расчета 50 мкл на 100 мг веса геля.

Лигирование. Выделенные по описанной выше методике продукты гидролиза рестриктазами векторной ДНК и ампликона гена *pal* лигировали ДНК-лигазой фага T4. Концентрации вектора и гена в реакционной смеси были равными 5 нг/мкл. Концентрация ДНК-лигазы фага T4 в реакционной смеси

составляла 5 ед/мкл. Реакцию проводили при 15 °С в течение 24 ч.

Приготовление компетентных клеток *E. coli* и трансформация. Проводили при помощи стандартных методик [24]. Компетентные клетки BL21(DE3)/pLysECodonPlus RP и Rozetta(DE3) трансформировали плазмидой pETPAL-28a и высевали на чашки с агаризованной средой LB, содержащей 40 мкг/мл канамицина и 20 мкг/мл хлорамфеникола. В контрольном варианте клетки трансформировали плазмидой pET-28a. Чашки инкубировали при 37 °С в течение ночи, после чего высевали трансформанты в 10 мл LB, содержащих 40 мкг/мл канамицина и 20 мкг/мл хлорамфеникола. Культуры инкубировали на роторной качалке при 180 об/мин и 23 °С до достижения оптической плотности 0,7 при  $\lambda = 590$ , затем индуцировали экспрессию добавлением ИПТГ до 1 мМ и инкубировали клетки на роторной качалке при тех же условиях в течение 24 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием при 4 °С в течение 15 мин при  $5000 \times g$ . Биомассу ресуспендировали на льду в 0,5 мл буфера для лизиса (50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,0, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ ФМСФ). Клетки разрушали при помощи ультразвукового дезинтегратора (4 импульса по 15 с с перерывом для охлаждения в 1 мин). Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при  $13000 \times g$ , 15 мин и 4 °С.

Электрофорез в ПААГ. Электрофорез клеточных лизатов и белков проводили с использованием диск-электрофореза в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих редуцирующих условиях по Леммли.

Очистка PAL хроматографией на Ni-NTA носителе. Очистку L-фенилаланин-аммоний-лиазы, слитой на C-конце с олигопептидом из шести остатков гистидина (PAL-His), проводили при помощи набора Ni-NTA Spin Kit фирмы Qiagen.

Все этапы очистки проводили при 4 °С. По 400 мкл осветленных лизатов клеток BL21(DE3) pLysE Codon-Plus RP/pETPAL-28a и Rozetta (DE3)/pETPAL-28a наносили на колонки с сорбентом Ni-NTA Silica, предварительно уравновешенным буфером NPI-10, и центрифугировали 5 мин при  $270 \times g$ . На дальнейших этапах центрифугирование проводили при  $890 \times g$  в течение 2 мин. Колонки промывали дважды 600 мкл буфера NPI-20. Затем целевой белок элюировали 400 мкл буфера NPI-500. Поскольку L-фенил-аланин-аммоний-лиаза *Rhodospiridium toruloides* является тетрамерным белком и, как следствие, могла быть прочно связана с сорбентом, на заключительном этапе провели элюцию 300 мкл буфера NP (50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 мМ NaCl), содержащего 100 мМ ЭДТА.

#### Результаты и их обсуждение

В связи со сложностью геномной организации гена *pal* (6 интронов) он был синтезирован согласно последовательности гена *pal*, выделенного из *R. toruloides* (GenBank: X12702.1). Ген обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NcoI* и *HindIII* для получения липких концов.

Для клонирования выбран экспрессионный вектор рЕТ28а, предназначенный для экспрессии рекомбинантных белков в *E. coli* и содержащий в своем составе ген резистентности к канамицину. Кроме того, вблизи полилинкера вектор содержит последовательность, кодирующую His-Тэг на конце, что значительно облегчает проведение хроматографии на Ni-содержащем носителе. При подготовке к клонированию вектор обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NcoI и HindIII и очищали от продуктов реакции с помощью набора QuickClean. После гидролиза эндонуклеазами рестрикции у вектора появились липкие концы, комплиментарные концам гена *pal*.

В условиях индукции в клетках *E. coli* BL21(DE3)/pLysECodonPlus RP и Rozetta(DE3), трансформированных плазмидой рЕТPAL-28а с геном L-фенилаланин-аммоний-лиазы *R. toruloides*, происходит накопление белка с молекулярным весом, близким к расчетному для PAL-6xHis, который равен 78,4 кДа (рис. 1). При этом в клетках контрольного штамма, не содержащего ген *pal*, такой белок отсутствует. Это позволяет сделать вывод о высокоэффективной экспрессии целевого гена. Кроме того, анализ клеточных фракций позволяет заключить, что белок практически полностью находится в растворимой форме.

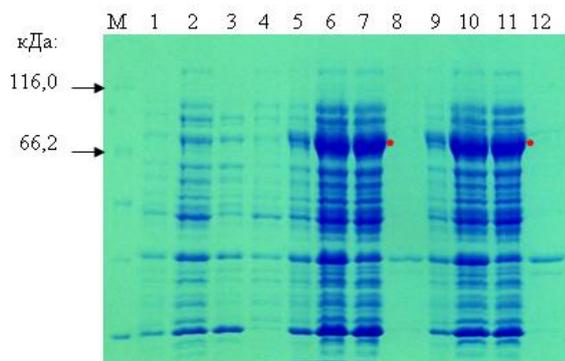


Рис. 1. Экспрессия PAL в *E. Coli*: М – маркеры молекулярного веса (Fermentas, cat. # SM0431); 1–4, BL21(DE3) pLysE CodonPlus RP/pET-28а: 1 – тотальный клеточный белок до индукции; 2 – тотальный клеточный белок через 24 ч после индукции; 3 – осветленный лизат клеток через 24 ч после индукции; 4 – нерастворимая фракция белка через 24 ч после индукции; 5–8, BL21(DE3) pLysE CodonPlus RP/pETPAL-28а: 5 – тотальный клеточный белок до индукции; 6 – тотальный клеточный белок через 24 ч после индукции; 7 – осветленный лизат клеток через 24 ч после индукции; 8 – нерастворимая фракция белка через 24 ч после индукции; 9–12, Rozetta (DE3)/pETPAL-28а: 9 – тотальный клеточный белок до индукции; 10 – тотальный клеточный белок через 24 ч после индукции; 11 – осветленный лизат клеток через 24 ч после индукции; 12 – нерастворимая фракция белка через 24 ч после индукции

В использованном в работе экспрессирующем векторе рЕТ28а непосредственно за кодирующей последовательностью расположен участок, кодирующий гексагистидиновую последовательность. Таким образом, в результате индуцируемой экспрессии клонированного в нем гена *pal* синтезировалась L-фенилаланин-аммоний-лиаза, содержащая дополнительную гексагистидиновую последовательность в С-концевой области

полипептидной цепи, позволяющую осуществлять аффинную чистку белка на Ni-NTA носителе.

Белок PAL-His эффективно связывается с Ni-NTA сорбентом и элюируется имидазолом (дорожки 4 и 9 на рис. 2).

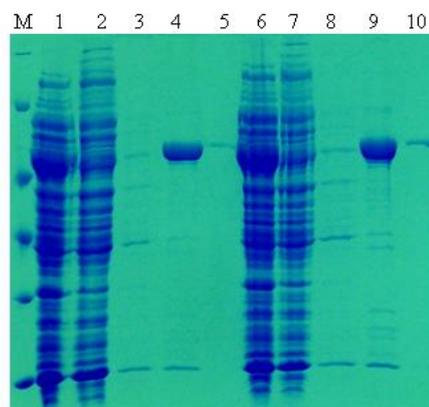


Рис. 2. Очистка PAL из клеток *E. Coli*: М – маркеры молекулярного веса (Fermentas, cat. # SM0431); 1–5, BL21(DE3) pLysE CodonPlus RP/pETPAL-28а: 1 – осветленный лизат; 2 – проскок (фракция белков, не связавшаяся с сорбентом); 3 – промывка буфером NPI-20; 4 – элюция буфером NPI-500; 5 – элюция буфером NP-ЭДТА; 6–10, Rozetta (DE3)/pETPAL-28а: 6 – осветленный лизат; 7 – проскок (фракция белков, не связавшаяся с сорбентом); 8 – промывка буфером NPI-20; 9 – элюция буфером NPI-500; 10 – элюция буфером NP-ЭДТА

Наличие остаточного белка PAL-His при элюции ЭДТА (дорожки 5 и 10), очевидно, обусловлено недостаточным объемом элюирующего буфера NPI-500. Поскольку выход целевого белка по электрофоретической оценке выше из *E. coli* Rozetta (DE3), этот штамм является более перспективным для наработки L-фенилаланин-аммоний-лиазы.

Благодаря наличию гексагистидиновой последовательности была достигнута высокая степень очистки (~90 %) рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы с помощью аффинной хроматографии на колонке с Ni-NTA носителем. Очищенный препарат обладал фенилаланин-аммоний-лиазной активностью.

Используемая в работе векторная конструкция показала свою высокую эффективность. Доля целевого белка, полученного после индукции, достигала в некоторых экспериментах 40 % суммарного белка клетки. Возможно, что при более тщательном подборе условий индукции и культивирования рекомбинантного штамма *E. coli* можно будет достигнуть и более высокого выхода целевого белка. Дополнительная гексагистидиновая последовательность позволила провести очистку фермента с сохранением его активности, при этом степень очистки составила более 90 %.

Таким образом, в настоящей работе синтезирован ген *pal*, кодирующий L-фенилаланин-аммоний-лиазу, выделенную из *R. toruloides*, который встроен в эффективную систему экспрессии. Получен продуцент фермента с уровнем экспрессии после индукции до 40 % общего белка клетки. Поскольку полученный белок имеет His-Тэг на С-конце, очистку проводили на колонке с Ni-NTA агарозой. Степень очистки белка составила более 90 %.

## Список литературы

1. Электронный ресурс: <http://www.bioinforma.ru/interesnoe/ryinok-fermentov-v-ozhidanii-peremen.html>
2. Электронный ресурс: <http://abercade.ru/research/industrynews/6059.html>
3. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms – a review / Z.S. Olempska-Beer, R.I. Merker, M.D. Ditto, et al // *Regulatory toxicology and pharmacology*. – 2006. – № 45. – P. 144–158.
4. Ahmad, S.K. Toxicological studies on lactose oxidase from *Microdochium nivale* expressed in *Fusarium venenatum* / S.K. Ahmad, D.S. Brinch, E.P. Friis // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* – 2004. – № 39. – P. 256–270.
5. Determining the safety of maltogenic amylase produced by rDNA technology / J.R. Andersen, B.K. Diderichsen, R.K. Hjortkjaer, et al // *J. Food Prot.* – 1987. – № 50. – P. 521–526.
6. Van Beilen, J.B. Enzyme technology: an overview / J.B. Van Beilen, Z. Li // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2002. – № 13. – P. 338–344.
7. Barbesgaard, P. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review / P. Barbesgaard, H.P. Heldt-Hansen, B. Diderichsen // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1992. – № 36. – P. 569–572.
8. High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae* / T. Christensen, H. Woeldike, E. Boel, et al // *Biotechnology*. – 1988. – № 6. – P. 1419–1422.
9. The safety assessment of novel foods. Guidelines prepared by ILSI Europe Novel Food Task Force / D.A. Jonas, E. Antignac, J.-M. Antoine, et al // *Food Chem. Toxicol.* – 1996. – № 34. – P. 931–940.
10. Roodveldt, C. Directed evolution of proteins for heterologous expression and stability / C. Roodveldt, A. Aharoni, D.S. Tawfik // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2005. – № 15. – P. 50–56.
11. Purification, characterization, and heterologous expression in *Fusarium venenatum* of a novel serine carboxypeptidase from *Aspergillus oryzae* / A.M. Blinkovsky, T. Byun, K.M. Brown, et al // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – № 65. – P. 3298–3303.
12. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* / F. Kunst, N. Ogasawara, I. Moszer, et al // *Nature*. – 1997. – № 390. – P. 249–256.
13. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp. / P.B. Pedersen, M.E. Bjornvad, M.D. Rasmussen, et al // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* – 2002. – № 36. – P. 155–161.
14. De Boer, A.S. On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review / A.S. de Boer, F. Priest, B. Diderichsen // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1994. – № 40. – P. 595–598.
15. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 / F.R. Blattner, et al // *Science*. – 1997. – № 277. – P. 1453–1462.
16. Human safety and genetically modified plants: a review of antibiotic resistance markers and future transformation selection technologies / D.A. Goldstein, B. Tinland, L.A. Gilbertson // *J. Appl. Microbiol.* – 2005. – № 99. – P. 7–23.
17. Keggins, K.M. Molecular cloning of genetically active fragments of *Bacillus* DNA in *Bacillus subtilis* and properties of the vector plasmid pUB110 / K.M. Keggins, P.S. Lovett, E.J. Duvall // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1978. – № 75. – P. 1423–1427.
18. The nucleotide sequence of pUB110: some salient features in relation to replication and its regulation / T. McKenzie, T. Hoshino, T. Tanaka, et al // *Plasmid*. – 1986. – № 15. – P. 93–103.
19. Schallmeyer, M. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production / M. Schallmeyer, A. Singh, O.P. Ward // *Can. J. Microbiol.* – 2004. – № 50. – P. 1–17.
20. Yanish-Perron, C. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors / C. Yanish-Perron, J. Vieira, J. Messing // *Gene*. – 1985. – № 33. – P. 103–119.
21. A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable amylase / T.H. Richardson, X. Tan, G. Frey, et al // *J. Biol. Chem.* – 2002. – № 277. – P. 26501–26507.
22. Pariza, M.W. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century / M.W. Pariza, E.A. Johnson // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* – 2001. – № 33. – P. 173–186.
23. Бабич, О.О. Клонирование и экспрессия гена L-фенилаланин-аммоний-лиазы и характеристика продукта его экспрессии / О.О. Бабич, Л.С. Солдатова, А.Ю. Просеков // *Биотехнология*. – 2011. – № 4. – С. 33–39.
24. Бабич, О.О. Выделение, очистка и некоторые свойства рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы *Rhodospiridium toruloides*, экспрессированной в клетках *E. coli* / О.О. Бабич, Л.С. Солдатова, И.С. Разумникова, А.Ю. Просеков // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 8. – С. 597–602.

ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт  
пищевой промышленности»,  
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.  
Тел./факс: (3842) 73-40-40  
e-mail: office@kemtipp.ru

## SUMMARY

A.J. Prosekov, O.O. Babich, L.S. Soldatova

**EXPERIENCE OF THE DEPARTMENT OF «BIONANOTECHNOLOGY»  
OF THE KEMEROVO INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY  
IN THE FIELD OF BIOTECHNOLOGY OF OBTAINING RECOMBINANT  
ENZYME PREPARATIONS**

The review of modern methods of obtaining recombinant enzymes for food industry is given. Optimum conditions to obtain recombinant L-phenylalanine-ammonia-lyase *Rhodospiridium toruloides* allocated from *Escherichia coli* have been established. The share of the special-purpose protein obtained after the induction was 40 % of the total cell protein. The clearing of the obtained protein on Ni-NTA agarose has been done. The degree of protein clearing was more than 90 %.

Recombinant strain, enzyme, cloning, genetic engineering, construction, L-phenylalanine-ammonia-lyase, transformation, expression vector.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology  
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia  
Phone/Fax: +7(3842) 73-40-40  
e-mail: office@kemtipp.ru

