

ПОЛУЧЕНИЕ НОВОГО ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО АФЛАТОКСИН-ДЕГРАДИРУЮЩЕГО ФЕРМЕНТА С ПОМОЩЬЮ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ В *Pichia pastoris**

И.Г. СИНЕЛЬНИКОВ^{1, 2}, И.Н. ЗОРОВ^{1, 2}, Ю.А. ДЕНИСЕНКО^{1, 2},
О.Д. МИКИТЮК¹, А.П. СИНИЦЫН^{1, 2}, Л.А. ЩЕРБАКОВА¹✉

Загрязнение микотоксинами наносит значительный экономический ущерб пищевой и кормовой промышленности и серьезно угрожает здоровью человека и животных из-за мутагенности, онкогенности и других опасных свойств этих вторичных метаболитов грибов. Метод ферментативной деградации является эффективной и экологически приемлемой альтернативой химическим методам деконтаминации сельскохозяйственного сырья и пищевой продукции. В проведенном нами исследовании система экспрессии рекомбинантных белков, которую мы адаптировали для повышения копийности дрожжевых гетерологичных генов в хромосоме дрожжей *Pichia pastoris*, была впервые применена для получения фермента ADTZ-оксидазы из *Armillaria tabescens*, разлагающей афлатоксин В₁. Синтетический ген *adtz* указанного фермента был интегрирован в геном штамма *P. pastoris* GS115 под контролем промотора глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Для амплификации гена *adtz* сконструировали олигонуклеотидные последовательности, к 5'-концу которых добавили специфические сайты рестрикции HindIII и NotI. После получения на основе вектора pPIG-1 плазмиды pPIG-ADTZ, содержащей ген *adtz*, ее линейризовали посредством расщепления эндонуклеазой рестрикции ApaI и методом электропорации трансформировали клетки реципиентного штамма *P. pastoris* GS115. Полученные трансформанты дрожжевых клеток отбирали на среде Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD) с антибиотиком. Вставку целевого гена подтверждали с помощью ПЦР-амплификации, рестрикционным анализом и секвенированием по Сэнгеру. В результате получили 54 трансформанта штамма *P. pastoris* GS115, содержавшие вставку целевого гена *adtz*, и среди них отобрали наиболее активный продуцент — клон ADTZ-14 (выход общего внеклеточного белка 2,1 мг/мл). Секретируемый этим клоном рекомбинантный фермент ADTZ представлял собой мономерный белок с молекулярной массой 78±3 кДа, обладающий высокой аффинностью к афлатоксину В₁ (АФВ₁). Сохранение функциональных свойств полученного белка было подтверждено экспериментами по оценке его способности деградировать АФВ₁ при кратковременной и длительной инкубации. Так, под воздействием ADTZ концентрация АФВ₁, добавленного в бесклеточную культуральную жидкость (КЖ) клона ADTZ-14, снижалась на 14 % уже через 2 ч инкубации при 40 °С. После более длительной инкубации при 30 °С содержание добавленного АФВ₁ (5 мг/мл) в бесклеточной КЖ было на 50 % ниже, чем в контроле (КЖ нетрансформированного штамма *P. pastoris* GS115), через 3 сут, а через 5 сут инкубации в тех же условиях деградация токсина достигала 80 %. Полученные данные свидетельствуют о достаточно высоком биотехнологическом потенциале нового продуцента рекомбинантного белка ADTZ и целесообразности дальнейших исследований по созданию на его основе ферментного препарата для деконтаминации растениеводческой продукции, загрязненной АФВ₁.

Ключевые слова: афлатоксин В₁, микотоксины, энзиматическая деградация, ADTZ из *Armillaria tabescens*, синтетический ген *adtz*, рекомбинантные белки, гетерологичная экспрессия, *Pichia pastoris*.

Афлатоксины (группа сходных по структуре вторичных метаболитов грибов рода *Aspergillus*, широко распространенных в природе) известны как опасные микотоксины, загрязняющие корма и другую сельскохозяйственную продукцию (1-4). В настоящее время идентифицировано более 20 афлатоксинов (АФ), их производных и близкородственных соединений (5). Среди них наиболее серьезную озабоченность в связи с контаминацией кормов для животноводства и птицеводства вызывают АФ В- и G-типов (6, 7). Эти микотоксины представляют собой производные дифуранокумарина, имеющие в своем составе связанную с кумариновым ядром бифурановую структуру и циклопентановое (у АФ В-типа) или лактонное кольцо (у АФ G-типа) (8, 9). Из-за токсичности, карцерогенности и мутагенности этих соединений, а также из-за их устойчивости к термическим обработкам (10, 11) корма и другая продукция растениеводства, загрязненная АФ выше допу-

* Исследования поддержаны Российским научным фондом (проект РНФ № 22-16-00153).

стимых гигиеническими регламентами концентраций, не годится для непосредственного использования или дальнейшей переработки в пищевые продукты. Во всем мире загрязнение этими микотоксинами, особенно АФВ₁, который по своей гепатотоксичности и опасности для теплокровных превосходит все остальные АФ (6, 7), наносит серьезный экономический ущерб как сельскому хозяйству, так и пищевой промышленности, а также создает проблемы для здоровья людей (1, 3).

Для деконтаминации используются физические, химические и микробиологические методы, которые, однако, имеют ряд известных ограничений (1, 12), поэтому постоянно ведется поиск иных эффективных, экологически безопасных и не влияющих на качество агропродукции средств и способов деградации АФ и детоксикации. С этой точки зрения весьма многообещающим представляется подход, основанный на способности ряда грибов (13-15) и бактерий (16-19) синтезировать ферменты, трансформирующие АФ до нетоксичных или менее токсичных соединений (20, 22). Использование бесклеточных препаратов, содержащих такие ферменты, позволяет избежать проблем, которые могут возникать при применении самих продуцентов (например, ухудшения органолептических свойств обрабатываемых продуктов, снижения их пищевой ценности). Кроме того, ферментные препараты технологически более удобны для обработки кормов (23) и, в отличие от препаратов для пищевой промышленности, не требуют дорогостоящей многоступенчатой очистки целевого продукта.

Известно, что источниками ферментов, деградирующих и детоксицирующих АФ, могут быть некоторые ксилотрофные базидиомицеты родов *Pleurotus* (24, 25), *Phanerochaete* и *Armillaria* (26-28). Так, из мицелия одного из представителей этих грибов — опенка дубового (*Armillaria tabescens*) с помощью гидрофобной и металл-хелатной хроматографии был выделен фермент с оксидазной активностью (28), названный авторами афлатоксин-детоксифизим (aflatoxin-detoxifizyme, ADTZ). Оказалось, что он способен катализировать раскрытие и последующий гидролиз дифуранового кольца (29) — структуры, связанной с токсичностью АФ В-типа. Дальнейшие исследования показали, что ADTZ представляет собой мономерный белок с молекулярной массой 76 кДа, обладающий высокой аффинностью к АФВ₁ (29). При контакте с ADTZ токсичность и мутагенность АФВ₁ значительно снижались (28, 30).

Эти данные свидетельствуют о перспективности разработки детоксицирующих препаратов, содержащих ADTZ. Однако их созданию прежде всего препятствует отсутствие доступной технологии получения внутриклеточного ADTZ из мицелия *A. tabescens* и отчасти тот факт, что для глубокого культивирования *A. tabescens* необходимы жидкие среды сложного состава, включающие весьма специфические и дорогостоящие компоненты (31), или требуется многостадийная процедура ферментации (28). Указанные препятствия могли бы быть преодолены при использовании гетерологичной системы экспрессии и создании доступного продуцента рекомбинантного белка ADTZ. Тем не менее до сих пор нет подходящей системы, позволяющей получить внеклеточный гетерологичный ADTZ в количестве, достаточном для его применения с целью деконтаминации растениеводческой продукции. В то же время в ряде современных работ (32, 33) продемонстрировано успешное использование клеток дрожжей *Pichia pastoris* в качестве реципиентов для гетерологичной экспрессии.

Ранее мы провели адаптацию системы экспрессии в *P. pastoris*, заключающуюся в модификации интеграционного вектора для повышения копийности гетерологичных генов в хромосоме дрожжей (интеграционный вектор и его получение запатентованы) (34). В настоящем исследовании этот подход впервые использован для создания нового продуцента афлаток-

син-деградирующего фермента.

Нашей целью была оптимизация и применение указанной системы для гетерологичной экспрессии ADTZ в *Pichia pastoris* GS115, а также оценка способности препарата бесклеточной культуральной жидкости (КЖ) полученного штамма *P. pastoris* ADTZ-14, содержащего внеклеточный рекомбинантный фермент ADTZ, деградировать АФВ₁.

Методика. Для экспрессии гена *adtz*, кодирующего афлатоксин-детоксифизим, использовали штамм дрожжей *Pichia pastoris* GS115 (syn. *Komagataellaphaffii*) («Thermo Fisher Scientific», США). Дрожжевые клетки культивировали в течение 3 сут при 30 °С на жидкой среде YPD (г/л: глюкоза — 20,0; дрожжевого экстракт — 10,0; мясной пептон — 20,0). Для получения плазмидной ДНК штамм *Escherichia coli* XL1-Blue («Agilent», США) выращивали при 37 °С на среде Лурия-Бертрани (г/л: триптон — 10, дрожжевой экстракт — 5, NaCl — 5; pH 7,2-7,5). Для экспрессии ADTZ использовали плазмиду pPIG-1 (34). Ген *adtz*, кодирующий фермент деградации афлатоксина у *A. tabescens* (GenBank AY941095.1), был синтезирован в ЗАО «Евроген» (Россия) с учетом кодонового состава у *P. pastoris*.

Аmplификацию гена *adtz* осуществляли методом ПЦР. Смесь для ПЦР (50 мкл) содержала 1× буфер с 3 мМ MgCl₂ и 5 ед. Taq полимеразы («NEB», Великобритания), 0,2 мкМ олигонуклеотидов ADTZ-fwd (5'-gaagctctATGG-CTACTACAAGT-3') и ADTZ-rev (5'-cgcggccgcTTAC-AATCTTCTCTC-3') и 0,1 нг ДНК в качестве матрицы. Реакцию проводили на амплификаторе T-100 («Bio-RAD», США) при следующих условиях: 95 °С в течение 15 с, 62 °С в течение 15 с, 72 °С в течение 120 с (25 циклов). Результаты амплификации оценивали методом электрофореза в 1 % агарозном геле в камере Sub-Cell GT Cell («Bio-RAD», США).

Продукт амплификации — вектор pPIG-1 расщепляли с помощью эндонуклеаз рестрикции HindIII и NotI согласно рекомендациям производителя («NEB», Великобритания).

Обработанные фрагменты лигировали T4 ДНК-лигазой (ЗАО «Евроген», Россия), и смесью (2 мкл) трансформировали клетки *Escherichia coli* XL1-blue («Agilent», США) методом теплового шока. Трансформанты отбирали на агаризованной среде Лурия-Бертрани, содержащей селективный антибиотик ампициллин (100 мкг/мл). Из ампициллин-резистентных трансформантов выделяли плазмиду pPIG-ADTZ, используя набор Plasmid Mini-prep (ЗАО «Евроген», Россия). Наличие вставки целевого гена в плазмиде pPIG-ADTZ подтверждали с помощью ПЦР-амплификации, рестрикционным анализом, как описано выше, а также секвенированием по Сэнгеру. Секвенирование осуществляли в обоих направлениях с праймеров, для амплификации гена. Секвенирование генов и синтез праймеров, использованных для амплификации, были выполнены в ООО «Синтол» (Россия).

Плазмиду pPIG-ADTZ линеаризовали расщеплением эндонуклеазой рестрикции AраI («NEB», Великобритания) в соответствии с протоколом производителя и интегрировали в *P. pastoris* GS115 методом электропорации (35). Селекцию трансформантов осуществляли на агаризованной среде YPD, в которую добавляли антибиотик зеонин («Thermo Fisher Scientific», США) в концентрации 200 мкг/мл. Из колоний, устойчивых к антибиотику, выделяли ДНК (36) и проверяли наличие вставки ADTZ с помощью ПЦР.

Рекомбинантный белок ADTZ получали при культивировании штамма-производителя *P. pastoris* ADTZ-14 в 24-луночных планшетах (3 мл жидкой среды YNB, 30 °С, аэрация 200 об/мин, 3 сут). Каждые 24 ч в лунки добавляли 40 % раствор глюкозы в 20 мМ калий-фосфатном буфере (pH 6,0) до конечной концентрации 2 %.

Анализ бесклеточной КЖ на наличие рекомбинантного ADTZ осу-

ществляли методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецил-сульфатом натрия (ДНС-ПААГ, Mini-PROTEAN® Tetra, «Bio-RAD», США). Концентрацию общего белка измеряли по Лоури (37).

Кинетику деградации АФВ₁ и АФГ₁ изучали в экспериментах с кратковременной инкубацией бесклеточной КЖ *P. pastoris* ADTZ-14. Коммерческие препараты АФВ₁ и АФГ₁ (ВНИИВСГЭ, Россия) растворяли в 20 мМ Na-фосфатном буфере (рН 6,7) до конечной концентрации каждого 2,5 мкг/мл. Контроль концентрации осуществляли, используя значения молярных коэффициентов экстинкции $\varepsilon = 21800$ и $\varepsilon = 17700$ (при $\lambda = 362$ нм) соответственно для АФВ₁ и АФГ₁. КЖ трансформанта *P. pastoris* ADTZ-14 инкубировали с растворами токсинов в ячейках планшета автосамплера, термостатированного при 30 или 40 °С. С помощью автосамплера из реакционной смеси каждые 30 мин в течение 2,5 ч отбирали аликвоты по 5 мкл и определяли содержание АФ методом обращенно-фазовой хроматографии на термостатированной при 30 °С колонке Kromasil Ethernity 5-C18 (4,6×250 мм) («Akzo Nobel», Швеция), снабженной соответствующей предколонкой, используя хроматографическую систему Agilent 1200 («Agilent Technologies», США) с диодно-матричным детектированием. Хроматографическое разделение проводили в градиенте вода/ацетонитрил (от 40 % до 68 % ацетонитрила за 20 мин, детектирование при 360, 235 и 225 нм, ширина щели 8 нм). Степень деградации АФВ₁ и АФГ₁ оценивали по изменению площади соответствующего хроматографического пика. В качестве контроля использовали КЖ нетрансформированного штамма *P. pastoris* GS115.

Для оценки способности рекомбинантного фермента ADTZ деградировать АФВ₁ при длительной инкубации к 1 мл образцов КЖ *P. pastoris* ADTZ-14 (2,1 мг общего белка/мл) после предварительной стерилизации фильтрованием (мембраны с размером пор 0,22 мкм, «Millipore», США) добавляли 1,0 мкг АФВ₁ («Sigma-Aldrich», США), растворенного в минимальном объеме метанола. В качестве контроля использовали образцы (1 мл) КЖ нетрансформированного штамма *P. pastoris* GS115, в которые вносили то же количество АФВ₁. Образцы инкубировали в течение 3 и 5 сут при рН 7,0 и 30 °С. Содержание АФВ₁ после инкубации определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на термостатированной (27 °С) колонке Symmetry C18 (5мкм, 150×4,6 мм) в изократическом режиме элюции (подвижная фаза метанол:вода 60:40, объем введенной пробы 10 мкл, $\lambda = 362$ нм), используя систему Waters 1525 Breeze с детектором Waters UV 2487 («Waters Corp.», США) (12, 38). Перед ВЭЖХ-анализом пробы КЖ разводили подвижной фазой в 100 раз. Измерения концентраций токсина вели в линейном диапазоне детектирования, рассчитывая концентрацию по калибровочной кривой зависимости площади пика стандарта АФВ₁ («Sigma-Aldrich», США) от его концентрации в опыте и контроле, и определяли процент деградации относительно количества токсина, обнаруженного к соответствующей контрольной пробе.

Статистическую обработку данных количественного определения АФВ₁ проводили, используя программу STATISTICA 6.1 («StatSoft, Inc.», США). Достоверность различий при $p \leq 0,05$ подтверждали с помощью *t*-теста Стьюдента для независимых переменных. В таблице и на рисунках указаны средние значения (*M*) двух измерений для каждого из трех биологических повторов со стандартными отклонениями ($\pm SD$).

Результаты. Ген разлагающего афлатоксин фермента из *A. tabescens*, был клонирован методом ПЦР с использованием разработанных олигонуклеотидов. Размер продукта амплификации, соответствовавшего синтезированному гену *adtz*, составил 2088 п.н. Секвенирование полученного продукта подтвердило его идентичность с последовательностью *A. tabescens*

(GenBank AY941095.1) (рис. 1).

ADTZ_sint	1	ATGGCTACTACAACGGTTCCACAGAGAGATTCTTGGCTGACAACTGCTCCATTGTGT	60
ADTZ_sint	61		151
ADTZ_A.tabescens	92	ATGCCACCACAACTGTCCACCGGGAGCGATTCTCGTCAGATAAAGTCTGCTCTTGTGT	150
ADTZ_sint	91	GGTATGGACATCAGAAAGTCTTTGATCAACTGCTTCCAAGGAAAGCTGTACACTCAC	120
ADTZ_A.tabescens	152	GGTATGGATATTGAAAGTCATTTGATCAGCTCAGCTTAAGGAAAAGCTTACACGCAT	211
ADTZ_sint	121	TATGTCACAGAAGCTCATGGGCTGGTGCCTGATCATTTCAAGCTCAATGGACTCCACAA	180
ADTZ_A.tabescens	212	TACGTGACCGAAGCTTCTTGGCGGGGCGCAAGAACTCCAGGCTCAAGCTCCGACG	270
ADTZ_sint	181	GCTACTGACTTGTATGATCTGTGATCTGACCTCTCTGTCAATGGTAAGCTGCGAAT	240
ADTZ_A.tabescens	272	CGGACAGATCTATGATCTGTGTACTCTTACGCTCAGCGTAAATGGAAAGCTGCCGAC	331
ADTZ_sint	241	TTGAATGCTCTCAAGACTTCTTGCG--TTTGAGTGAAGTGAAGTGAAGCTGTGACT	298
ADTZ_A.tabescens	332	CTGAATGCCCTTAAGACGTCGTGAGGCTTTCAGAG--GACGATGGGAGGCTGTGATAC	389
ADTZ_sint	299	AGTACACTGTTCAAGTTTGTCCCAACTGGTGAACACAGACTCTGGATCACTAAGA	358
ADTZ_A.tabescens	390	AGTACACGGTCAGGATTTGAGCACTTGTCAACTACAGACTCTGGATTTACGAAGA	449
ADTZ_sint	359	TCATTCCTAGAGTTGATGCTGAGAAATCGAATCTGTTGTCAAGCACTTCTCAATGCTG	418
ADTZ_A.tabescens	450	TCATTCCTCCGCTGACGCGAGAAAAGTTGAGTCAGTGGTCAAAGCTCTAGCAACGACG	509
ADTZ_sint	419	ATCAAGGTTCTGCTCTGTTCAACAAATGAAACAACACATCTATGCTGTGCTCCAGAGT	478
ADTZ_A.tabescens	510	ACCAGGCTCGGCACATTTACCAGTTGAAACAACACATATATGCGCTTCTCCTGAGT	569
ADTZ_sint	479	CTGCCTTGTTCATTTGGTAAGCGTAAAGATGGTCACTGTTTCCAACACTACTTGGGTGAAC	538
ADTZ_A.tabescens	570	CAGCCCTATTTCATTTGCAAAAAGGAGGAGCTGCTCACTCAAAAATTAATCTTGGTGAAC	629
ADTZ_sint	539	CAGTGTGGTATGCAAGAGTTGATGCTATCAGAAATGTTCTGAGAAATGGGCTTGACG	598
ADTZ_A.tabescens	630	CTGTTGGAGATGCTGAGGTGATGCTATCCAGAAATGCTGCTGAGAAATGAGGCTTGATA	689
ADTZ_sint	599	TTTTGAACACTAGAGTTAAGAAGATGGTCTGGAGATTACACTCTGTGGTGTCTCTG	658
ADTZ_A.tabescens	690	TCCTCAACTCTCGGTGAAGAAGATGGAGCGGCTATACAGCTCTTAGTGTGCTCTG	749
ADTZ_sint	659	CCAAAACACTCTCCCTCATCTGTTCTAGACTTCCAGATTGATTCTACTCTGCCAAGTGG	718
ADTZ_A.tabescens	750	CTAAAACAGTCCACCCTCGTGCATGACTTCCAAATGACTCACTCCGGTAAATTTGA	809
ADTZ_sint	719	CCATTGAGTATGTTGACTATGCTTCTCTTGCATAAAGTTGTGCAAGCTTTCGCAAGAG	778
ADTZ_A.tabescens	810	CGATTGAGTATGGGACTACCGCTCATCTCAAAAGAGTTGTGCGCCGCTTCCAGGAGG	869
ADTZ_sint	779	CTAAAACAGTATGCTAATGATCATCAATGCTATGATGAAAGCTATGTCAAGTCTCT	838
ADTZ_A.tabescens	870	CCAAAACAGTATACCGGAACGATCATCAATCAGCGATGATGAAAGCTATGTCAAGTGT	929
ADTZ_sint	839	TCAACTCTGGTTCCATTCGAAACACAAAAGCTGCTCAACTGAGTGGGTTAAGGACATG	898
ADTZ_A.tabescens	930	TCAACTAGGATCAATTCGGAACACAAAAGCTGCTCAACAGAAATGGGTAAGATGATTG	989
ADTZ_sint	899	GTCAGTGTGTGAGCTCAGATTTGGTTTGGTGAAGCTTATGTTGATCCATGTTGGTGAAG	958
ADTZ_A.tabescens	990	GACCGGTTGTAGAGTCTTACATCGGTTCTGCAAACTATGTGCAACATATGTCGACG	1049
ADTZ_sint	959	GAGCTGAGTGGGAAGGTTTCCACAGCAATGTTGACAAAACAACTGCTCGCAAGTATGAAG	1018
ADTZ_A.tabescens	1050	CGCGGAAATGGGAGGGTTTCACTGCTCATGTCGACAGCAGCTGAGTGCAGGATCGAAG	1109
ADTZ_sint	1019	CTCTGGTGAATGGAGCACCAAAAGTTGATCAAGTATTGCCATGGGACTGACTTCCGAAG	1078
ADTZ_A.tabescens	1110	CATTGGTTAACGGTCTCTAAAGTTGATCAAGAGCTTCCGTTGGGAGGACGGACTCGAGG	1169
ADTZ_sint	1079	TTGATGTGTTTCAGAAAACAGACTTCACTGCTTTGGAAAGTTGTTTCTTCCGCTACTGGTG	1138
ADTZ_A.tabescens	1170	TTGACGCTCTCAGGAAAGCCGACTTACTGCTTGGAAAGTCTGATCATTGTTCAACAGGAG	1229
ADTZ_sint	1139	GTATTCTGCTGGTATTAACATTCCAAATATTATGAAGTCAGAGAAAGTACTGGTTTCA	1198
ADTZ_A.tabescens	1230	GTATTCTGCTCGGAAATCAATATACCAACTATTATGAAGTCGGGAAAGTCAACAGGTTTA	1289
ADTZ_sint	1199	AAAATGTTTCAATGGCTAACATTTGCGTCTGCTAAAGTTCCAAGGAAAGGTTGACTTTCA	1258
ADTZ_A.tabescens	1290	AGAAATGTTTTCGCTAGCGAATATTTGGCGCCAAAGTACCAAGCGAGGTTAACTTTCA	1349
ADTZ_sint	1259	TTCACTCGAGCGATGTTGAGTTGATCAAGCTCTGGGATTTAGAGCTTTCCGAGCTGCAAG	1318
ADTZ_A.tabescens	1350	TCATCTGATGACGTAGAATATATAAGCTTGGGATGTCGCGGCTTTGAACTTCAGG	1409
ADTZ_sint	1319	TTGCTAATCATGAGTTGTGGGACATGATAGTGGCAAGTTGTCCAAAGAGGTCAGATG	1378
ADTZ_A.tabescens	1410	TGGCCAACCAAGCACTTTGGGTCATGGCTCGCGCAAGCTTTTCCAAAGAGGTCGATG	1469
ADTZ_sint	1379	GTAACATGAACTTGCATCTGAGAAAGTCATCAATCAATTGACTGGCAACCTATCACTT	1438
ADTZ_A.tabescens	1470	GGAAACTGAACTTGCATCCGAAAAGGTCATAAACCTCTGACTGGAAAGCGATAACTTT	1529
ADTZ_sint	1439	CTTGGTCAAAACAGGTCAAACACAGATCTGTGTTGGGTGAAGTTAGTCTTCCATGG	1498
ADTZ_A.tabescens	1530	CATGGTATAAGCCAGGCAAAACCCGGATCTGTTTTAGCGAAAGTGTGCTCGTCAATGG	1589
ADTZ_sint	1499	AAGAGTGCAGAGCTGAGACTGTTGCTTACTTGGTTTCCAATTTCCGCTCTGAAAA	1558
ADTZ_A.tabescens	1590	AAGAAATGTCGGGCGAGACCCTGAGCTCTACTTGGTTAGCAACTCGATATTCTTAAAA	1649
ADTZ_sint	1559	TCTTCAACTACGTTGACAAAACAGATATTGAAGACATTCAGTACATCACCTTCTGTGTTGA	1618
ADTZ_A.tabescens	1650	TTTTCATTTACGTGACAAAGCAAGACATGGAAGATATCCAGTACATCACGTTCTTGTCTTA	1709
ADTZ_sint	1619	TGGCTAGAGCTGTTTGGAGCTTTGGAAATCTATGATCTGCTACCAAGAAACATGGTC	1678
ADTZ_A.tabescens	1710	TGGCCCGGCTGGTCTGCGGGCAGTAGAGTTTATGATCAGCCACCAAGAAAGCAGGAC	1769
ADTZ_sint	1679	AAAGTACATGCAAGCTGATGGGATCACTCAGTACTTGTATCAAGCTGGATTTGCTTA	1738
ADTZ_A.tabescens	1770	AGGCACATATGCAAGCCAGAATGGGCTAACCAGTACCTGATTCAAAGCTGGGATTCGGA	1829
ADTZ_sint	1739	GATTGGAATGATTCAAGATGCTAATGGTGAATGGGAACTTGTATGTAGAGTTGATA	1798
ADTZ_A.tabescens	1830	GACTTGAATGATCAGGATGCCAACGGGCAACTGAAAACCTATACGTTGGGTTGACC	1889
ADTZ_sint	1799	GAGAGAAAGTCTTGTCCAAGGCAAGAAAGTTTGGTCAACTGTGATTTGATTTGAATTCGAAG	1858
ADTZ_A.tabescens	1890	GGGAGAAAGTGTGTTCCAAGGAAAGGAGGTTTGGTCAATTTGCTGATGCAACTCAAG	1949
ADTZ_sint	1859	TTAG--AAAGTCAACTGCTGATGGTACAGGATCTAGAGACTTCTACACTACTTGAAGTGA	1918
ADTZ_A.tabescens	1950	TCCGAAAAGT--ACCGCAGACGGCAGGCTCCCGAGATTTCTACCAAGCTGACCCGA	2007
ADTZ_sint	1919	ACCAACTCTGGTTGGGAAAGTAAAGTACAGAGACTTGTGCTGAAGAAAGTGTACCTCG	1976
ADTZ_A.tabescens	2008	ACCAACTCTGGATGGGAGGGCAAGATCCGAGACATCGTTTGAAGAAAGCTTCTCTCG	2067
ADTZ_sint	1977	TAAAGTCTCGTTCAACTTACACTCTGTTGCTCAATGGTGAAGTCAAGTGAAGAGATTA	2036
ADTZ_A.tabescens	2068	AAAAAATTTTGTCAACCCAATACATTTGCTGCTCAACGGGAAAGTCAAGCTCAAGAGTA	2127
ADTZ_sint	2037	TCCATGACTGCACTGGAGTGAATGAATCTTCAATGAGAGAAAGTGT	2086
ADTZ_A.tabescens	2128	TCCTTTGACGGCTGCCGGGTAATGAAAGTTTCATTGAGAGACGATTTG	2177

Рис. 1. Визуализация выравнивания последовательности гена *adtz* с оптимизированными кодами

и природного гена *adtz* из *Armillaria tabescens* (GenBank AY941095.1, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Оптимизация кодового состава осуществлялась ЗАО «Евроген» (Россия) с использованием таблицы частоты встречаемости кодонов для *Pichia pastoris* (<https://www.kazusa.or.jp>).

Полученный рекомбинантный ген был интегрирован в вектор pPIG-1 рестриктазно-лигазным методом. Рестрикционный анализ полученной в результате этого новой плазмиды после ее двойного расщепления рестриктазами HindIII и NotI приводил к получению продуктов размерами 5500 и 2100 п.н., что подтверждало правильность интеграции целевой последовательности в вектор pPIG-1. Полученная рекомбинантная плаزمиды (рис. 2) была названа pPIG-ADTZ.

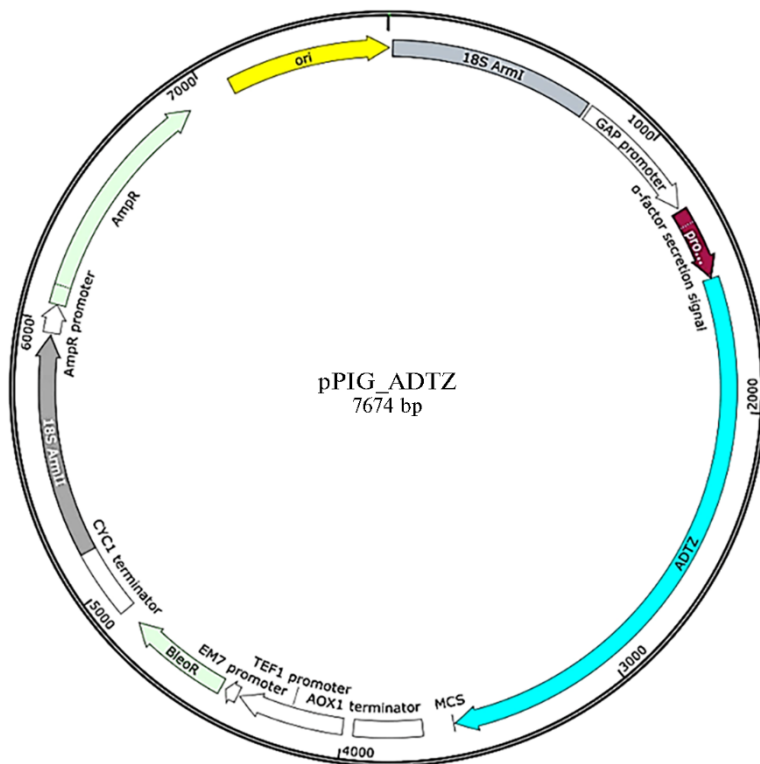


Рис. 2. Карта плазмиды pPIG-ADTZ, полученной при клонировании последовательности синтезированного гена афлатоксин-детоксифизима (ADTZ) *adtz* (*synthetic_ADTZ*) в вектор pPIG-1.

Плазмиду pPIG-ADTZ, линейризованную эндонуклеазой рестрикции AраI, электропорировали в компетентные клетки *P. pastoris* GS115 и отбирали трансформанты на среде YPD с зеоцином. При клонировании было получено 154 клональных колонии. Геномная ДНК, выделенная из 70 случайно выбранных трансформированных клонов, была проанализирована методом ПЦР для идентификации вставки гена *adtz*. ПЦР-анализ ДНК этих трансформантов, выращенных на селективной среде, показал, что по крайней мере 54 клон содержали целевую вставку *adtz*. Среди них наиболее продуктивным оказался клон ADTZ-14, который отобрали для дальнейшей работы. Экспрессия ADTZ в клетках этого клона уже после 72 ч культивирования приводила к накоплению в КЖ внеклеточного рекомбинантного белка, наблюдаемый размер которого согласно анализу с помощью ДСН-ПААГ составлял 78 ± 3 кДа (рис. 3), тогда как в КЖ нетрансформированного реципиентного *P. pastoris* GS115 белков с сопоставимой массой мы не обнаружили. В КЖ трансформированного клона ADTZ-14 концентрация об-

шего белка составила 2,1 мг/мл.

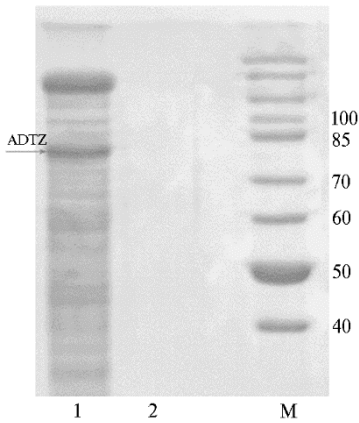


Рис. 3. Электрофореграмма белков культуральной жидкости штамма *Pichia pastoris* ADTZ-14 (1), трансформированного рекомбинантным вектором rPIG-ADTZ с синтезированным геном афлатоксин-детоксифизима (ADTZ) *adtz*, и реципиента *P. pastoris* GS115 (2); М — маркер молекулярной массы PageRuler™ 26614 («Thermo Fisher Scientific», США).

Сравнение кинетики деградации АФВ₁ и АФГ₁ в КЖ *P. pastoris* ADTZ-14 показало, что рекомбинантный фермент способен разрушать оба токсина, однако его эффективность в отношении АФВ₁ оказалась значительно выше, чем для АФГ₁. Так, под действием КЖ продуцента рекомбинантного внеклеточного ADTZ уже через 2 ч инкубации концентрация токсина АФВ₁ снижалась примерно на 14 % по

сравнению с исходной, в то время как для АФГ₁ снижение составило лишь 4 % (рис. 4).

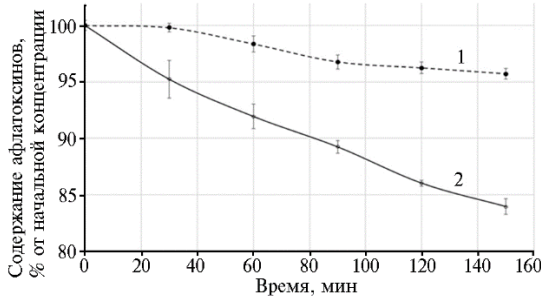


Рис. 4. Кинетика деградации афлатоксинов G₁ (1) и B₁ (2) в бесклеточной культуральной жидкости штамма *Pichia pastoris* ADTZ-14, трансформированного рекомбинантным вектором rPIG-ADTZ с синтезированным геном афлатоксин-детоксифизима (ADTZ) *adtz*, при 40 °С и pH 6,7 ($n = 3$, $M \pm SD$).

Полученные результаты соответствовали данным других авторов, отмечавших высокую

специфичность внутриклеточного ADTZ из *A. tabescens* в отношении АФВ₁ (29). В связи с этим мы исследовали деградационную активность рекомбинантного ADTZ в отношении указанного токсина при его более длительной инкубации с бесклеточной КЖ штамма *P. pastoris* ADTZ-14.

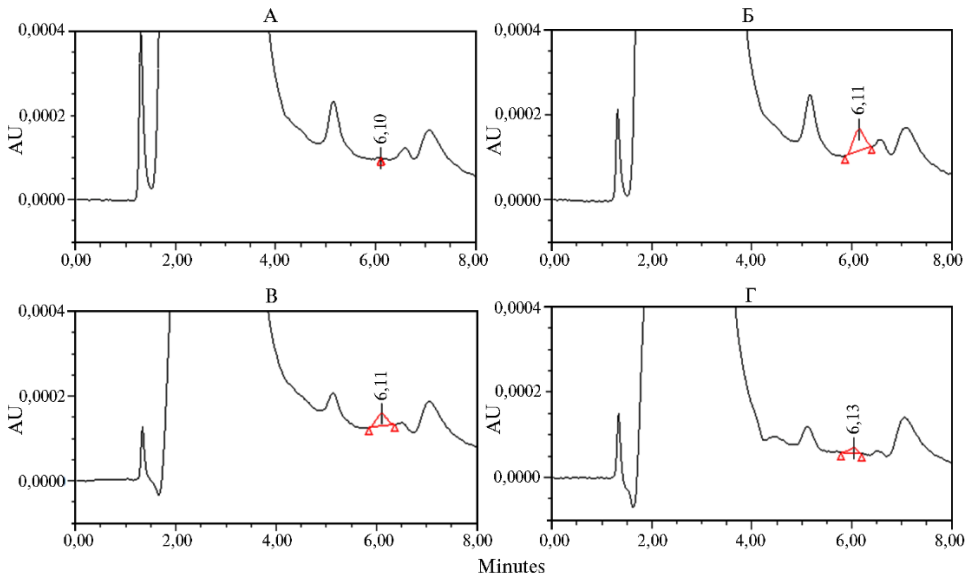


Рис. 5. Хроматограммы образцов культуральной жидкости (КЖ) *Pichia pastoris* (инкубация при

30 °C и pH 7,0).

А: КЖ нетрансформированного рецепиентного штамма GS115 (контроль).

Б: КЖ GS115 + афлатоксин В₁ (АФВ₁, 1 мкг/мл) после инкубации (контрольный образец). Пик на хроматограмме соответствует 10 нг АФВ₁ во введенной пробе.

В и Г: КЖ штамма *P. pastoris* ADTZ-14, трансформированного рекомбинантным вектором pPIG-ADTZ с синтезированным геном афлатоксин-детоксифизима (ADTZ) *adtz*. + АФВ₁ (1 мкг/мл) соответственно через 3 и 5 сут инкубации.

В этих экспериментах было обнаружено, что через 3 сут содержание добавленного в КЖ токсина снижалось почти в 2 раза, а через 5 сут эффективность его деградации достигала 80 % (рис. 5, табл.).

Ферментативная деградация афлатоксина В₁ (АФВ₁) в бесклеточной культуральной жидкости (КЖ) штамма-трансформанта *Pichia pastoris* ADTZ-14, секретирующего рекомбинантный афлатоксин-детоксифизим (ADTZ), в зависимости от времени инкубации ($n = 6, M \pm SD$)

Штамм	Продолжительность инкубации				
	0 ч	72 ч		120 ч	
	АФВ ₁ , мкг/мл	АФВ ₁ , мкг/мл	деградация, %	АФВ ₁ , мкг/мл	деградация, %
ADTZ-14	0,97±0,01	0,57±0,06	41,2 ^a	0,19±0,04	80,4 ^b
GS115 (контроль)	0,98±0,01	1,01±0,01	0,0 ^c	0,90±0,05	0,1 ^c

Примечание. Штамм ADTZ-14 получен трансформацией рецепиента *P. pastoris* GS115 рекомбинантным вектором pPIG-ADTZ с синтезированным геном афлатоксин-детоксифизима (ADTZ) *adtz*. Перед инкубацией в КЖ вносили АФВ₁ до концентрации 1 мкг/мл; для 0 ч указаны концентрации, обнаруженные в пробах КЖ перед инкубацией (открываемость от 96 до 99 %).

^{abc} Различия между процентами деградации, отмеченными разными буквами, статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Представленные нами данные свидетельствуют о достаточно высоком биотехнологическом потенциале нового продуцента рекомбинантного ADTZ и расширяют пока что ограниченный спектр полученных с помощью системы гетерологичной экспрессии в *P. pastoris* рекомбинантных ферментов других ксилиторофных грибов, разлагающих АФВ₁ (39).

Следует также отметить, что продуцент ADTZ-14 характеризовался достаточно высоким для *P. pastoris* уровнем экспрессии внеклеточных белков. Вероятно, использование синтетического гена с оптимизированными кодонами способствовало увеличению продуктивности дрожжевых клеток. Подобный подход был успешно применен ранее для экспрессии бактериальной α -амилазы в *P. pastoris* (40). Однако по последним данным, использование синтетических генов способно приводить к неправильному фолдингу белка, деградации и снижению его активности и стабильности, что может быть причиной частичной деградации секретируемых рекомбинантных белков (41), которую, как отмечено выше, мы наблюдали и в наших экспериментах при электрофоретическом анализе КЖ трансформированного клона ADTZ-14. Поэтому необходимо продолжить исследования по повышению эффективности деградации АФВ₁ рекомбинантным ADTZ, дополнительной проверке воздействия этого рекомбинантного фермента на другие афлатоксины, а также эксперименты по обработке ферментным препаратом растениеводческой продукции, загрязненной АФВ₁. Не исключено также, что гетерологичная экспрессия с использованием других эукариот, например штаммов мицелиальных грибов, которые применяются для биопереработки корма с целью повышения его питательной ценности, позволит получить новые продуценты высокоактивного экстрацеллюлярного ADTZ. Подобные продуценты могли бы оказаться перспективным для одновременной деконтаминации растительных кормов, загрязненных афлатоксином, и повышения доступности их питательных компонентов.

Таким образом, разработанная нами ранее система экспрессии для

повышения копийности гетерологичных генов в *Pichia pastoris* впервые применена для получения рекомбинантного белка, способного разлагать АФВ₁. При этом была осуществлена трансформация дрожжевых клеток плазмидой pRIG-ADTZ и получены 154 рекомбинантных клона *P. pastoris*, 77 % которых содержали целевую последовательность синтетического гена афлатоксин-детоксифизима ADTZ — *adtz*. Выход белка у наиболее продуктивного трансформанта ADTZ-14 составил 2,1 мг/мл бесклеточной культуральной жидкости, причем в этом случае около половины пула всех внеклеточных белков приходилось на рекомбинантный ADTZ, инкубация АФВ₁ с которым приводила к деградации 80 % добавленного токсина. Полученный штамм-трансформант *P. pastoris* ADTZ-14, секретирующий функциональный ADTZ, можно рассматривать в качестве продуцента доступного и достаточно активного в отношении АФВ₁ рекомбинантного фермента, на основе которого в будущем могут разрабатываться препараты для энзиматической деградации этого микотоксина. Подтверждение деконтаминационного потенциала рекомбинантного фермента будет свидетельствовать о целесообразности оптимизации биотехнологии для увеличения выхода целевого продукта и разработки его препаративной формы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Джавахия В.Г., Стацюк Н.В., Щербакова Л.А., Поплетаева С.Б. *Афлатоксины: ингибирование биосинтеза, профилактика загрязнения и деконтаминация агропродукции*. М., 2017.
2. Coppock R.W., Christian R.G., Jacobsen V.J. Aflatoxins. In: *Veterinary toxicology* /R.C. Gupta (ed.). Academic Press, 2018: 983-994 (doi: 10.1016/B978-0-12-811410-0.00069-6).
3. Кононенко Г.П., Зотова Е.В., Буркин А.А. Опыт микотоксикологического обследования зернофуражных культур. *Сельскохозяйственная биология*, 2021, 56(5): 958-967 (doi: 10.15389/agrobiology.2021.5.958rus).
4. Кононенко Г.П., Буркин А.А. Токсины микромицетов в генеративных органах растений семейства *Fabacea*. *Сельскохозяйственная биология*, 2021, 56(5): 968-978 (doi: 10.15389/agrobiology.2021.5.968rus).
5. Kumar P., Mahato D.K., Kamle M., Mohanta T.K., Kang S.G. Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Front. Microbiol.*, 2017, 7: 2170 (doi: 10.3389/fmicb.2016.02170).
6. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, 4(11): 1-23 (doi: 10.1038/nri1255).
7. El-Sayed R.A., Jebur A.B., Kang W., El-Demerdash F.M. An overview on the major mycotoxins in food products: characteristics, toxicity, and analysis. *Journal of Future Foods*, 2022, 2(2): 91-102 (doi: 10.1016/j.jfutfo.2022.03.002).
8. Schuda P.F. Aflatoxin chemistry and syntheses. In: *Syntheses of natural products. Topics in current chemistry, V. 91*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1980: 79-81 (doi: 10.1007/3-540-09827-5_3).
9. Mahato D.K., Lee K.E., Kamle M., Devi S., Dewangan K.N., Kumar P., Kang S.G. Aflatoxins in food and feed: an overview on prevalence, detection and control strategies. *Front. Microbiol.*, 2019, 10: 2266 (doi: 10.3389/fmicb.2019.02266).
10. Probst C., Njapau H., Cotty P.J. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73(8): 2762-2764 (doi: 10.1128/aem.02370-06).
11. Medina A., Gilbert M.K., Mack B.M., O'Brian G.R., Rodriguez A., Bhatnagar D., Payne G., Magan N. Interactions between water activity and temperature on the *Aspergillus flavus* transcriptome and aflatoxin B₁ production. *Int. J. Food Microbiol.*, 2017, 256: 36-44 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.020).
12. Shcherbakova L.A., Statsyuk N.V., Mikityuk O.D., Nazarova N.A., Dzhavakhiya V.G. Aflatoxin B₁ degradation by metabolites of *Phoma glomerata* PG41 isolated from natural substrate colonized by aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. *Jundishapur J. Microbiol.*, 2015, 8(1): e24324 (doi: 10.5812/jjm.24324).
13. Ji C., Fan Y., Zhao L. Review on biological degradation of mycotoxins. *Anim. Nutr.*, 2016, 2(3): 127-133 (doi: 10.1016/j.aninu.2016.07.003).
14. Verhecke C., Liboz T., Mathieu F. Microbial degradation of aflatoxin B₁: current status and future advances. *Int. J. Food Microbiol.*, 2016, 237: 1-9 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.028).
15. Alberts J.F., Gelderblom W.C.A., Botha A., van Zyl W.H. Degradation of aflatoxin B₁ by fungal laccase enzymes. *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, 135: 47-52 (doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.022).

16. Taylor M.C., Jackson C.J., Tattersall D.B., French N., Peat T.S., Newman J., Briggs L.J., Lalapikar G.V., Campbell P.M., Scott C., Russell R.J., Oakeshott J.G. Identification and characterization of two families of F₄₂₀H₂-dependent reductases from *Mycobacteria* that catalyse aflatoxin degradation. *Mol. Microbiol.*, 2010, 78(3): 561-575 (doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07356.x).
17. Zhao L.H., Guan S., Gao X., Ma Q.G., Lei Y.P., Bai X.M., Ji C. Preparation, purification and characteristics of an aflatoxin degradation enzyme from *Myxococcus fulvus* ANSM068. *J. Appl. Microbiol.*, 2011, 110(1): 147-155 (doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04867.x).
18. Wang Y., Zhao C., Zhang D., Zhao M., Zheng D., Lyu Y., Cheng W., Guo P., Cui Z. Effective degradation of aflatoxin B₁ using a novel thermophilic microbial consortium TADC7. *Bioresource Technology*, 2017, 224: 166-173 (doi: 10.1016/j.biortech.2016.11.033).
19. Guo Y.P., Qin X.J., Tang Y., Ma Q.G., Zhang J.Y., Zhao L.H. CotA laccase, a novel aflatoxin oxidase from *Bacillus licheniformis*, transforms aflatoxin B-1 to aflatoxin Q(1) and epi-aflatoxin Q(1). *Food Chem.*, 2020, 325: 126877 (doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126877).
20. Adebo O.A., Njobeh P.B., Gbashi S., Nwinyi O.C., Mavumengwana V. Review on microbial degradation of aflatoxins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2017, 57(15): 3208-3217 (doi: 10.1080/10408398.2015.1106440).
21. Xu H.W., Wang L.Z., Sun J.D., Wang L.P., Guo H.Y., Ye Y.L., Sun X.L. Microbial detoxification of mycotoxins in food and feed. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2022, 62(18): 4951-4969 (doi: 10.1080/10408398.2021.1879730).
22. Li C.H., Li W.Y., Hsu I.N., Liao Y.Y., Yang C.Y., Taylor M.C., Liu Y.F., Huang W.H., Chang H.H., Huang H.L., Lo S.C., Lin T.Y., Sun W.C., Chuang Y.Y., Yang Y.C., Fu R.H., Tsai R.T. Recombinant aflatoxin-degrading F₄₂₀H₂-dependent reductase from *Mycobacterium smegmatis* protects mammalian cells from aflatoxin toxicity. *Toxins*, 2019, 11(5): 259 (doi: 10.3390/toxins11050259).
23. Kolosova A., Stroka J. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. *World Mycotoxin Journal*, 2011, 4(3): 225-256 (doi: 10.3920/WMJ2011.1288).
24. Loi M., Fanelli F., Zucca P., Liuzzi V.C., Quintieri L., Cimmarusti M.T., Monaci L., Haidukowski M., Logrieco A.F., Sanjust E., Mulè G. Aflatoxin B₁ and M₁ degradation by Lac2 from *Pleurotus pulmonarius* and redox mediators. *Toxins*, 2016, 8(9): 245 (doi: 10.3390/toxins8090245).
25. Brana M.T., Sergio L., Haidukowski M., Logrieco A.F., Altomare C. Degradation of aflatoxin B-1 by a sustainable enzymatic extract from spent mushroom substrate of *Pleurotus eryngii*. *Toxins*, 2020, 12(1): 49 (doi: 10.3390/toxins12010049).
26. Wang J., Ogata M., Hirai H., Kawagishi H. Detoxification of aflatoxin B₁ by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordid* YK-624. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2011, 314(2): 164-169 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02158.x).
27. Yao D.S., Liang R., Liu, D.L., Gu L.Q., Ma L., Chen W.Q. Screening of the fungus whose multienzyme system has catalytic detoxification activity towards aflatoxin B₁ (Part I). *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1998, 864: 579-585 (doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb10385.x).
28. Liu D.-L., Yao D.-S., Liang Y.Q., Zhou T.-H., Song Y.-P., Zhao L., Ma L. Production, purification, and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifyzyme from *Armillariella tabescens* (E-20). *Food Chem. Toxicol.*, 2001, 39(5): 461-466 (doi: 10.1016/s0278-6915(00)00161-7).
29. Cao H., Liu D., Mo X., Xie C., Yao D. A fungal enzyme with the ability of aflatoxin B₁ conversion: purification and ESI-MS/MS identification. *Microbiol. Res.*, 2011, 166(6): 475-483 (doi: 10.1016/j.micres.2010.09.002).
30. Wu Y.Z., Lu F.P., Jiang H.L., Tan C.P., Yao D.S., Xie C.F., Liu D.L. The furofuran-ring selectivity, hydrogen peroxide-production and low Km value are the three elements for highly effective detoxification of aflatoxin oxidase. *Food Chem. Toxicol.*, 2015, 76: 125-131 (doi: 10.1016/j.fct.2014.12.004).
31. Xingming Y. *Oral liquid medicine from ferments of Armilarilla tabescens*. China PAT # CN1679642. Priority date 11.05.2004. Publication date 01.08.2007.
32. Chahardooli M., Niazi A., Aram F., Sohrabi S.M. Expression of recombinant Arabian camel lactoferricin-related peptide in *Pichia pastoris* and its antimicrobial identification. *J. Sci. Food Agric.*, 2016, 96(2): 569-575 (doi: 10.1002/jsfa.7125).
33. Wang Y., Wang Y., Jiang J., Zhao Y., Xing F., Zhou L. High expression of zearalenone degrading enzyme in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(2): 372-380 (doi: 10.13345/j.cjb.190150).
34. Синельников И.Г., Зоров И.Н., Сеницына О.А., Сеницын А.П., Рожкова А.М. Интеграционный вектор для многокопийной интеграции генов в 18Sp РНК дрожжей *Pichia pastoris*. № RU 2752904С1, Моск. ФГУ Исследовательский Центр «Основы Биотехнологии» РАН (РФ). Заявл. 02.09.20. Оpubл. 11.08.21. Бюл. № 23.
35. Lin-Cereghino J., Wong W.W., Xiong S., Giang W., Luong L.T., Vu J., Johnson S.D., Lin-Cereghino G.P. Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechniques*, 2005, 38(1): 44-48 (doi: 10.2144/05381BM04).
36. Lxoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*, 2011, 50(5): 325-328 (doi: 10.2144/000113672).

37. Waterborg J.H., Matthews H.R. The Lowry method for protein quantitation. In: *Proteins. Methods in molecular biology*TM, vol 1 /J.M. Walker (ed.). Humana Press, 1984: 1-3 (doi: 10.1385/0-89603-062-8:1).
38. Dzhavakhiya V.G., Voinova T.M., Popletaeva S.B., Statsyuk N.V., Limantseva L.A., Shcherbakova L.A. Effect of various compounds blocking the colony pigmentation on the aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus*. *Toxins*, 2016, 8(11): 313 (doi: 10.3390/toxins8110313).
39. Yang P., Xiao W., Lu S., Jiang S., Zheng Z., Zhang D., Zhang M., Jiang S., Jiang S. Recombinant expression of *Trametes versicolor* aflatoxin B₁-degrading enzyme (TV-AFB₁D) in engineering *Pichia pastoris* GS115 and application in AFB₁ degradation in AFB₁-contaminated peanuts. *Toxins*, 2021, 13(5): 349 (doi: 10.3390/toxins13050349).
40. Wang J.R., Li Y.Y., Liu D.N., Liu J.S., Li P., Chen L.Z., Xu S.D. Codon optimization significantly improves the expression level of α -amylase gene from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris*. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 248680 (doi: 10.1155/2015/248680).
41. Liu K., Ouyang Y., Lin R., Ge C., Zhou M. Strong negative correlation between codon usage bias and protein structural disorder impedes protein expression after codon optimization. *J. Biotechnol.*, 2022, 343: 15-24 (doi: org/10.1016/j.jbiotec.2021.11.001).

¹ФГБНУ Всероссийский НИИ фитопатологии,

143050 Россия, Московская обл., Одинцовский р-н,

п/о Б. Вязёмы, стр. 5, ВНИИФ,

e-mail: mod-39@list.ru, larisavniif@yahoo.com ✉;

²ФГУ ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН,

119071 Россия, г. Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2,

e-mail: sinelnikov.i@list.ru, inzorov@mail.ru, denisenkoyura@mail.ru,

apsinitsyn@gmail.com

Поступила в редакцию

20 сентября 2022 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2022, V. 57, № 6, pp. 1166-1177

A NEW PRODUCER OF A RECOMBINANT AFLATOXIN-DEGRADING ENZYME OBTAINED VIA HETEROLOGOUS EXPRESSION IN *Pichia pastoris*

I.G. Sinelnikov^{1, 2}, I.N. Zorov², Yu.A. Denisenko^{1, 2}, O.D. Mikityuk¹, A.P. Sinitsyn^{1, 2}, L.A. Shcherbakova¹ ✉

¹All-Russian Research Institute of Phytopathology, 5, ul. Institute, Bolshie Vyazemy, Odintsovsky District, Moscow Province, 143050 Russia, e-mail mod-39@list.ru, larisavniif@yahoo.com (✉ corresponding author);

²Federal Research Center Fundamentals of Biotechnology RAS, 33/2, Leninskii prospect, Moscow, 119071 Russia, e-mailsinelnikov.i@list.ru, inzorov@mail.ru, denisenkoyura@mail.ru, apsinitsyn@gmail.com

ORCID:

Sinelnikov I.G. orcid.org/0000-0001-6359-1125

Zorov I.N. orcid.org/0000-0001-6888-172X

Denisenko Yu.A. orcid.org/0000-0003-2363-0374

Mikityuk O.D. orcid.org/0000-0003-2022-7256

Sinitsyn A.P. orcid.org/0000-0001-6429-8254

Shcherbakova L.A. orcid.org/0000-0003-0254-379X

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the Russian Scientific Foundation (project No. 22-16-00153)

Received September 20, 2022

doi: 10.15389/agrobiology.2022.6.1166eng

Abstract

Contamination of food and feed with mycotoxins causes significant economic losses in the food and feed industry and poses a serious threat to the human health and animal life because of mutagenic, carcinogenic and other disruptive properties of these secondary metabolites of fungi. Enzymatic degradation of mycotoxins represents an efficient and environmentally safe alternative to the chemical decontamination of agricultural and food products. In this study, a synthetic *adtz* gene encoding ADTZ, an aflatoxin-degrading oxidase from *Armillaria tabescens*, was integrated into the genome of a *Pichia pastoris* GS115 strain under the control of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter. To amplify the *adtz* gene, oligonucleotide sequences were constructed with specific restriction sites HindIII and NotI added to the 5' end. The *adtz* gene-containing pPIG-ADTZ plasmid obtained with the use of the pPIG-1 vector was linearized by digestion with restriction endonuclease ApaI, followed by transforming the cells of *P. pastoris* recipient strain GS115 by electroporation. The transformed yeast cell were selected on YPD medium with an antibiotic. PCR amplification, restriction analysis and Sanger sequencing confirmed insertion of the target gene. As a result, 54 transformed clones containing the target gene were obtained, and the most productive clone secreting the recombinant ADTZ-14 (2.1 mg/ml of the total extracellular protein) was selected. Recombinant ADTZ

represented a monomeric protein (78 ± 3 kDa) possessing a high affinity to aflatoxin B₁ (AFB₁). Saving the functional properties of the recombinant protein was shown using experiments on assessment of its ability to degrade AFB₁ during short-time and prolonged incubation. The obtained protein was able to degrade AFB₁ by 14 % after a 2-h incubation at 40 °C; after 72 and 120 h of incubation at 30 °C, the content of AFB₁ in ADTZ-14 culture liquid (CL) reduced by 50 and 80 %, respectively, compared to content in CL of non-transformed control GS115. These data suggest a quite high biotechnological potential of a new recombinant ADTZ preparation in relation to the decontamination of agricultural products contaminated with AFB₁. Thus, the earlier developed expression system intended to increase the copy number of heterologous genes in *Pichia pastoris* was first used to obtain a recombinant protein able to degrade AFB₁. Using this approach, we transformed yeast cells with the pPIG-ADTZ plasmid and obtained 154 recombinant clones of *P. pastoris*, 77 % of which contained the target sequence of the *adtz* gene. Productivity of the best transformant (clone ADTZ-14) was 2.1 mg of protein per 1 ml of culture liquid, and about half of the pool of the extracellular proteins fell to the share of recombinant ADTZ able to degrade 80 % of AFB₁ incubated in cell-free culture broth at 30 °C and pH 7.0.

Keywords: aflatoxin B₁, mycotoxins, enzymatic degradation, ADTZ from *Armillaria ta-bescens*, synthetic *adtz* gene, recombinant proteins, heterologous expression, *Pichia pastoris*.