

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

И.Г. СИНЕЛЬНИКОВ<sup>1, 2</sup>, И.Н. ЗОРОВ<sup>1, 2</sup>, Ю.А. ДЕНИСЕНКО<sup>1, 2</sup>,  
О.Д. МИКИТЮК<sup>1</sup>, А.П. СИНИЦЫН<sup>1, 2</sup>, Л.А. ЩЕРБАКОВА<sup>1</sup>✉

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 В<sub>1</sub>. 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 В<sub>1</sub> (АФВ<sub>1</sub>). Сохранение функциональных свойств полученного белка было подтверждено экспериментами по оценке его способности деградировать АФВ<sub>1</sub> при кратковременной и длительной инкубации. Так, под воздействием ADTZ концентрация АФВ<sub>1</sub>, 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 АФВ<sub>1</sub> (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 АФВ<sub>1</sub>.

Ключевые слова: афлатоксин В<sub>1</sub>, 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 АФВ<sub>1</sub>, 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 АФВ<sub>1</sub> (29). При контакте с ADTZ токсичность и мутагенность АФВ<sub>1</sub> 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 АФВ<sub>1</sub>.

**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 MgCl<sub>2</sub> 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 АФВ<sub>1</sub> и АФГ<sub>1</sub> изучали в экспериментах с кратковременной инкубацией бесклеточной КЖ *P. pastoris* ADTZ-14. Коммерческие препараты АФВ<sub>1</sub> и АФГ<sub>1</sub> (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 АФВ<sub>1</sub> и АФГ<sub>1</sub>. 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 АФВ<sub>1</sub> и АФГ<sub>1</sub> оценивали по изменению площади соответствующего хроматографического пика. В качестве контроля использовали КЖ нетрансформированного штамма *P. pastoris* GS115.

Для оценки способности рекомбинантного фермента ADTZ деградировать АФВ<sub>1</sub> 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 АФВ<sub>1</sub> («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 АФВ<sub>1</sub>. Образцы инкубировали в течение 3 и 5 сут при рН 7,0 и 30 °С. Содержание АФВ<sub>1</sub> 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 АФВ<sub>1</sub> («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 АФВ<sub>1</sub> 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	ATGGCTACTACAACGGTTCCACAGAGAGATTCTTGGCTGACAAAGTCTGCTCAATGTGT	60
ADTZ_A.tabescens	91		151
ADTZ_sint	62	ATGGCCACCACAACTGTCCACCGGGAGCGATTCTCGTCAGATAAAGTCTGCTCTTGTGT	150
ADTZ_A.tabescens	92		160
ADTZ_sint	121	GGTATGGACATCAGAAAGTCTTTGATCAACTGCTTCCAAGGAAAGCTGTACACTCAC	210
ADTZ_A.tabescens	152		211
ADTZ_sint	121	GGTATGGACATCAGAAAGTCTTTGATCAACTGCTTCCAAGGAAAGCTGTACACTCAC	211
ADTZ_A.tabescens	152		211
ADTZ_sint	181	TATGTACACGAAGCTCATGGGGCTGGTGCCTGATCAATCAAGCTCAATGGACTCCACAA	270
ADTZ_A.tabescens	212		271
ADTZ_sint	181	TATGTACACGAAGCTCATGGGGCTGGTGCCTGATCAATCAAGCTCAATGGACTCCACAA	270
ADTZ_A.tabescens	212		271
ADTZ_sint	240	GCTACTGACTTGTATGATCTGTGTGATCTGACTTCTCTGTCAATGGTAAGCTGCGAGAT	240
ADTZ_A.tabescens	272		241
ADTZ_sint	241	GCGACAGATCTATGATCTGTGTGATCTGACTTCAAGCTGACGCTAAATGGAAAGCTGCCGAC	331
ADTZ_A.tabescens	332		332
ADTZ_sint	299	TTGAATGCTCTCAAGACTTCTTGG--TTTGAGTGAAGTGAAGTGAAGCTGTGACTCT	398
ADTZ_A.tabescens	341		399
ADTZ_sint	299	TTGAATGCTCTCAAGACTTCTTGG--TTTGAGTGAAGTGAAGTGAAGCTGTGACTCT	398
ADTZ_A.tabescens	341		399
ADTZ_sint	358	CTGAATGCCCTTAAGACGCTGTGAGGCTTTCAGAG--GACGATGGGAGGCTGTGATAC	418
ADTZ_A.tabescens	390		419
ADTZ_sint	358	CTGAATGCCCTTAAGACGCTGTGAGGCTTTCAGAG--GACGATGGGAGGCTGTGATAC	418
ADTZ_A.tabescens	390		419
ADTZ_sint	418	AGTACACGGTCCAGGTATTGAGCACTTGTCAACTACAAAGCTGTGGATTTACGAAGA	448
ADTZ_A.tabescens	450		449
ADTZ_sint	418	AGTACACGGTCCAGGTATTGAGCACTTGTCAACTACAAAGCTGTGGATTTACGAAGA	448
ADTZ_A.tabescens	450		449
ADTZ_sint	449	TCATTCCTAGAGTTGATGCTGAGAAATCGAATCTGTTGTCAAGCACTTCTCAATGCTG	498
ADTZ_A.tabescens	450		499
ADTZ_sint	449	TCATTCCTAGAGTTGATGCTGAGAAATCGAATCTGTTGTCAAGCACTTCTCAATGCTG	498
ADTZ_A.tabescens	450		499
ADTZ_sint	509	TCATTCCTAGAGTTGATGCTGAGAAATCGAATCTGTTGTCAAGCACTTCTCAATGCTG	509
ADTZ_A.tabescens	419		510
ADTZ_sint	509	TCATTCCTAGAGTTGATGCTGAGAAATCGAATCTGTTGTCAAGCACTTCTCAATGCTG	509
ADTZ_A.tabescens	419		510
ADTZ_sint	578	ACCAGGGCTCGGCACATTTACCAGTGTGAACAACACATATATGCGCTTCTCCTGAGT	578
ADTZ_A.tabescens	510		579
ADTZ_sint	578	ACCAGGGCTCGGCACATTTACCAGTGTGAACAACACATATATGCGCTTCTCCTGAGT	578
ADTZ_A.tabescens	510		579
ADTZ_sint	538	CTGACCTTGTTCATTTGGTAAGCGTAAAGATGGTCACTGTTTCCAACACTACTTGGGTGAAC	538
ADTZ_A.tabescens	570		571
ADTZ_sint	538	CTGACCTTGTTCATTTGGTAAGCGTAAAGATGGTCACTGTTTCCAACACTACTTGGGTGAAC	538
ADTZ_A.tabescens	570		571
ADTZ_sint	539	CAGCCCTATTTCATTTGCAAAAGGAGGAGCGTCACTGATCAAAATTAATCTTGTGGTGAAC	528
ADTZ_A.tabescens	570		571
ADTZ_sint	539	CAGCCCTATTTCATTTGCAAAAGGAGGAGCGTCACTGATCAAAATTAATCTTGTGGTGAAC	528
ADTZ_A.tabescens	570		571
ADTZ_sint	628	CAGTGTGGATGCGAGAGTTGATGCTGAGCACTCAGAAATGCTGAGAAATGGGCTTGAAG	628
ADTZ_A.tabescens	630		629
ADTZ_sint	628	CAGTGTGGATGCGAGAGTTGATGCTGAGCACTCAGAAATGCTGAGAAATGGGCTTGAAG	628
ADTZ_A.tabescens	630		629
ADTZ_sint	658	CTGTTGGAGATGCTGAGGTGATGCTATCCAGAAATGCTGAGAAATGGGCTTGAAG	658
ADTZ_A.tabescens	650		651
ADTZ_sint	658	CTGTTGGAGATGCTGAGGTGATGCTATCCAGAAATGCTGAGAAATGGGCTTGAAG	658
ADTZ_A.tabescens	650		651
ADTZ_sint	749	TCCTCAACTCTCGGTGAAGAAAGTGGAGCGGCTGATACAGCTCTTAGTGTGCTCTG	749
ADTZ_A.tabescens	690		741
ADTZ_sint	749	TCCTCAACTCTCGGTGAAGAAAGTGGAGCGGCTGATACAGCTCTTAGTGTGCTCTG	749
ADTZ_A.tabescens	690		741
ADTZ_sint	718	CCAAAACATCTCCTCATCTGTTCTGACTTCCAGATTGATCTACTCTGCCAAGTGTG	718
ADTZ_A.tabescens	750		751
ADTZ_sint	718	CCAAAACATCTCCTCATCTGTTCTGACTTCCAGATTGATCTACTCTGCCAAGTGTG	718
ADTZ_A.tabescens	750		751
ADTZ_sint	809	CTAAAACAGTCCACCCTCGGTGATGACTTCCAAATGACTCACTCCGGCTAAATTTGA	809
ADTZ_A.tabescens	810		811
ADTZ_sint	809	CTAAAACAGTCCACCCTCGGTGATGACTTCCAAATGACTCACTCCGGCTAAATTTGA	809
ADTZ_A.tabescens	810		811
ADTZ_sint	838	CGATTGAGTATGGGACTACCGCTCATCTCAAAGAGGTTGTCGCCCGCTTCCAGGAGG	838
ADTZ_A.tabescens	870		871
ADTZ_sint	838	CGATTGAGTATGGGACTACCGCTCATCTCAAAGAGGTTGTCGCCCGCTTCCAGGAGG	838
ADTZ_A.tabescens	870		871
ADTZ_sint	898	CCAAAACAGTATCCCGGAACGATCATCAATCAGCGATGATCGAAGGCTATGTCAAGTGT	898
ADTZ_A.tabescens	870		871
ADTZ_sint	898	CCAAAACAGTATCCCGGAACGATCATCAATCAGCGATGATCGAAGGCTATGTCAAGTGT	898
ADTZ_A.tabescens	870		871
ADTZ_sint	958	TCAACTAGGATCAATTCGGAAACAAAGCTGCGTCAACAGAAATGGGTAAGGATGTTG	958
ADTZ_A.tabescens	990		991
ADTZ_sint	958	TCAACTAGGATCAATTCGGAAACAAAGCTGCGTCAACAGAAATGGGTAAGGATGTTG	958
ADTZ_A.tabescens	990		991
ADTZ_sint	1049	GACCGGTTGATAGAGTCTTACATCGGGTCTGCGAAACTATGTGCGACCATATGCGCAG	1049
ADTZ_A.tabescens	1050		1051
ADTZ_sint	1049	GACCGGTTGATAGAGTCTTACATCGGGTCTGCGAAACTATGTGCGACCATATGCGCAG	1049
ADTZ_A.tabescens	1050		1051
ADTZ_sint	1109	GAGCTGAGTGGGAAGGTTTCACAGCACTGTTGACAAACAACTGCTCGCAAGTATGAAG	1109
ADTZ_A.tabescens	1050		1051
ADTZ_sint	1109	GAGCTGAGTGGGAAGGTTTCACAGCACTGTTGACAAACAACTGCTCGCAAGTATGAAG	1109
ADTZ_A.tabescens	1050		1051
ADTZ_sint	1169	CGCGGAAATGGGAGGTTTCACTGCTCATGTCGACAGCAGCTGAGTGCAGGATCGAAG	1169
ADTZ_A.tabescens	1110		1111
ADTZ_sint	1169	CGCGGAAATGGGAGGTTTCACTGCTCATGTCGACAGCAGCTGAGTGCAGGATCGAAG	1169
ADTZ_A.tabescens	1110		1111
ADTZ_sint	1138	CATTGGTTAACGGTCTCTAAAGTGTATCAAGAGCTTCCGTTGGGAGGAGGACTCGAGG	1138
ADTZ_A.tabescens	1170		1171
ADTZ_sint	1138	CATTGGTTAACGGTCTCTAAAGTGTATCAAGAGCTTCCGTTGGGAGGAGGACTCGAGG	1138
ADTZ_A.tabescens	1170		1171
ADTZ_sint	1229	TTGATGTGTTTCAGAAACAGACTTCACTGCTTTGGAAGTGTGTTCTTCCGCTACTGGTG	1229
ADTZ_A.tabescens	1170		1171
ADTZ_sint	1229	TTGATGTGTTTCAGAAACAGACTTCACTGCTTTGGAAGTGTGTTCTTCCGCTACTGGTG	1229
ADTZ_A.tabescens	1170		1171
ADTZ_sint	1299	TTGACGCTCTCAGGAAAGCGGACTTACTGCTTGGAAAGTGTGATCATTTTGAACACAGAG	1299
ADTZ_A.tabescens	1230		1231
ADTZ_sint	1299	TTGACGCTCTCAGGAAAGCGGACTTACTGCTTGGAAAGTGTGATCATTTTGAACACAGAG	1299
ADTZ_A.tabescens	1230		1231
ADTZ_sint	1289	GTATTCTCGCCGGAATCAATATACCACAACTATATGAAGTCCGGGAAAGTCAACAGGTTTA	1289
ADTZ_A.tabescens	1230		1231
ADTZ_sint	1289	GTATTCTCGCCGGAATCAATATACCACAACTATATGAAGTCCGGGAAAGTCAACAGGTTTA	1289
ADTZ_A.tabescens	1230		1231
ADTZ_sint	1349	AAAATGTTTCAATGGCTAACATTTGCGTCTGCTAAAGTTCCAAAGGAAAGTGTACTTTCA	1349
ADTZ_A.tabescens	1290		1291
ADTZ_sint	1349	AAAATGTTTCAATGGCTAACATTTGCGTCTGCTAAAGTTCCAAAGGAAAGTGTACTTTCA	1349
ADTZ_A.tabescens	1290		1291
ADTZ_sint	1318	AGAAATGTTTTCGCTAGCAAAATTTGGGCGCCAAAGTACCAAGAGGAGTAACTTTCA	1318
ADTZ_A.tabescens	1350		1351
ADTZ_sint	1318	AGAAATGTTTTCGCTAGCAAAATTTGGGCGCCAAAGTACCAAGAGGAGTAACTTTCA	1318
ADTZ_A.tabescens	1350		1351
ADTZ_sint	1409	TTCACTCTGATGACGTAGAACTATAAAGCTTGGGATGCTGCGGCTTGTGAACCTCAGG	1409
ADTZ_A.tabescens	1410		1411
ADTZ_sint	1409	TTCACTCTGATGACGTAGAACTATAAAGCTTGGGATGCTGCGGCTTGTGAACCTCAGG	1409
ADTZ_A.tabescens	1410		1411
ADTZ_sint	1438	TTGCTTAATCATGAGTTGTGGGACATGATAGTGGCAAGTGTTCCAAAGAGGTCAGATG	1438
ADTZ_A.tabescens	1410		1411
ADTZ_sint	1438	TTGCTTAATCATGAGTTGTGGGACATGATAGTGGCAAGTGTTCCAAAGAGGTCAGATG	1438
ADTZ_A.tabescens	1410		1411
ADTZ_sint	1469	TGGCCAAACGACCACTTTGGGTCTGGCTCGCGCAAGCTTTTCCAAAGAGGCTGCTGAT	1469
ADTZ_A.tabescens	1470		1471
ADTZ_sint	1469	TGGCCAAACGACCACTTTGGGTCTGGCTCGCGCAAGCTTTTCCAAAGAGGCTGCTGAT	1469
ADTZ_A.tabescens	1470		1471
ADTZ_sint	1529	GGAACATGAACTTGCATCCGAAAGGTCATAAACCTCTGACTGGAAGGCGATTAACCT	1529
ADTZ_A.tabescens	1470		1471
ADTZ_sint	1529	GGAACATGAACTTGCATCCGAAAGGTCATAAACCTCTGACTGGAAGGCGATTAACCT	1529
ADTZ_A.tabescens	1470		1471
ADTZ_sint	1498	CTTGGTACAAACAGGTCAGAAACAGACTTCTGTTGGGTGAAGTGTAGTCTTCCATGG	1498
ADTZ_A.tabescens	1530		1531
ADTZ_sint	1498	CTTGGTACAAACAGGTCAGAAACAGACTTCTGTTGGGTGAAGTGTAGTCTTCCATGG	1498
ADTZ_A.tabescens	1530		1531
ADTZ_sint	1559	CATGGTATAAGCCAGGCAAAACCGGATCTGTTTTAGCGAAAGTGTGCTCGTCAATGG	1559
ADTZ_A.tabescens	1590		1591
ADTZ_sint	1559	CATGGTATAAGCCAGGCAAAACCGGATCTGTTTTAGCGAAAGTGTGCTCGTCAATGG	1559
ADTZ_A.tabescens	1590		1591
ADTZ_sint	1618	AAGAGTGCAGAGCTGAGACTGTTGCTTACTTGGTTTCCAATTTCCGCTCTGAAAA	1618
ADTZ_A.tabescens	1650		1651
ADTZ_sint	1618	AAGAGTGCAGAGCTGAGACTGTTGCTTACTTGGTTTCCAATTTCCGCTCTGAAAA	1618
ADTZ_A.tabescens	1650		1651
ADTZ_sint	1678	AAGAAATGTCGGGCGGAGACCGTAGCGCTACTTGGTTAGCAACTCGATATCTTTAAAA	1678
ADTZ_A.tabescens	1650		1651
ADTZ_sint	1678	AAGAAATGTCGGGCGGAGACCGTAGCGCTACTTGGTTAGCAACTCGATATCTTTAAAA	1678
ADTZ_A.tabescens	1650		1651
ADTZ_sint	1709	TCTTCAATACGTCGACAAAGCAAGATATGAAGACATTCAGTACATCACCTTCTGTGTGA	1709
ADTZ_A.tabescens	1610		1611
ADTZ_sint	1709	TCTTCAATACGTCGACAAAGCAAGATATGAAGACATTCAGTACATCACCTTCTGTGTGA	1709
ADTZ_A.tabescens	1610		1611
ADTZ_sint	1769	TTTTCGCTAGAGCTGTTTGGAGGCTTTGGAAATCTATGATCTGCTACCAAGAAACATGGT	1769
ADTZ_A.tabescens	1710		1711
ADTZ_sint	1769	TTTTCGCTAGAGCTGTTTGGAGGCTTTGGAAATCTATGATCTGCTACCAAGAAACATGGT	1769
ADTZ_A.tabescens	1710		1711
ADTZ_sint	1738	TGGCCCGGCTGGTCTGCGGGCAGTAGAGTTTATGATCAGCCACCAAGAAAGCAGGAC	1738
ADTZ_A.tabescens	1770		1771
ADTZ_sint	1738	TGGCCCGGCTGGTCTGCGGGCAGTAGAGTTTATGATCAGCCACCAAGAAAGCAGGAC	1738
ADTZ_A.tabescens	1770		1771
ADTZ_sint	1829	AGGCACATATGACGCGCAGAATGGGCTAACCCAGTACCTGATTCAAAGCTGGGATTCGGA	1829
ADTZ_A.tabescens	1770		1771
ADTZ_sint	1829	AGGCACATATGACGCGCAGAATGGGCTAACCCAGTACCTGATTCAAAGCTGGGATTCGGA	1829
ADTZ_A.tabescens	1770		1771
ADTZ_sint	1858	GACTTGAATGATCAGGATGCCAAGCGGCAACTGAAAACCTATACGTTGGGTTGACC	1858
ADTZ_A.tabescens	1830		1831
ADTZ_sint	1858	GACTTGAATGATCAGGATGCCAAGCGGCAACTGAAAACCTATACGTTGGGTTGACC	1858
ADTZ_A.tabescens	1830		1831
ADTZ_sint	1918	GAGAGAAAGTCTTGTCCAAGGCAAGAAAGTTTGGTCAACTGTGATTTGATTTGCAAG	1918
ADTZ_A.tabescens	1890		1891
ADTZ_sint	1918	GAGAGAAAGTCTTGTCCAAGGCAAGAAAGTTTGGTCAACTGTGATTTGATTTGCAAG	1918
ADTZ_A.tabescens	1890		1891
ADTZ_sint	1949	GGGAGAAAGTCTTGTCCAAGGCAAGAAAGTTTGGTCAACTGTGATTTGATTTGCAAG	1949
ADTZ_A.tabescens	1910		1911
ADTZ_sint	1949	GGGAGAAAGTCTTGTCCAAGGCAAGAAAGTTTGGTCAACTGTGATTTGATTTGCAAG	1949
ADTZ_A.tabescens	1910		1911
ADTZ_sint	1916	TTAG--AAAGTCAACTGCTGATGTTACAGGATCTAGAGACTTCTACACTACTTGGACTGA	1916
ADTZ_A.tabescens	1950		1951
ADTZ_sint	1916	TTAG--AAAGTCAACTGCTGATGTTACAGGATCTAGAGACTTCTACACTACTTGGACTGA	1916
ADTZ_A.tabescens	1950		1951
ADTZ_sint	2007	TCCGGAAGAAAT--ACCAGCAGAGCGCAGCGCTCCCGAGATTTCTACCAAGCTGACCCGA	2007
ADTZ_A.tabescens	2008		2009
ADTZ_sint	2007	TCCGGAAGAAAT--ACCAGCAGAGCGCAGCGCTCCCGAGATTTCTACCAAGCTGACCCGA	2007
ADTZ_A.tabescens	2008		2009
ADTZ_sint	2036	ACCAATCTTGGTGGGAAAGTAAAGTACAGAGACTTGTGCTGAAGAAAGTGTACCTCG	2036
ADTZ_A.tabescens	2008		2009
ADTZ_sint	2036	ACCAATCTTGGTGGGAAAGTAAAGTACAGAGACTTGTGCTGAAGAAAGTGTACCTCG	2036
ADTZ_A.tabescens	2008		2009
ADTZ_sint	2087	TAAAGATCTCGTCAACCTAACACTCTGTTGCTCAATGGTGAAGTCAAGTGAAGAGATTA	2087
ADTZ_A.tabescens	2068		2069
ADTZ_sint	2087	TAAAGATCTCGTCAACCTAACACTCTGTTGCTCAATGGTGAAGTCAAGTGAAGAGATTA	2087
ADTZ_A.tabescens	2068		2069
ADTZ_sint	2127	AAAAAATTTTGTCAACCCAATACATTTGCTGCTCAACGGCAAGTCAAGCTCAAGAGATTA	2127
ADTZ_A.tabescens	2037		2038
ADTZ_sint	2127	AAAAAATTTTGTCAACCCAATACATTTGCTGCTCAACGGCAAGTCAAGCTCAAGAGATTA	2127
ADTZ_A.tabescens	2037		2038
ADTZ_sint	2177	TCCTTTGACGGCTGCCGGGTAAATGAAAGTTTCATTTGAGAGACGATTTGT	2177
ADTZ_A.tabescens	2128		2129

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

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 плазмида (рис. 2) была названа pPIG-ADTZ.

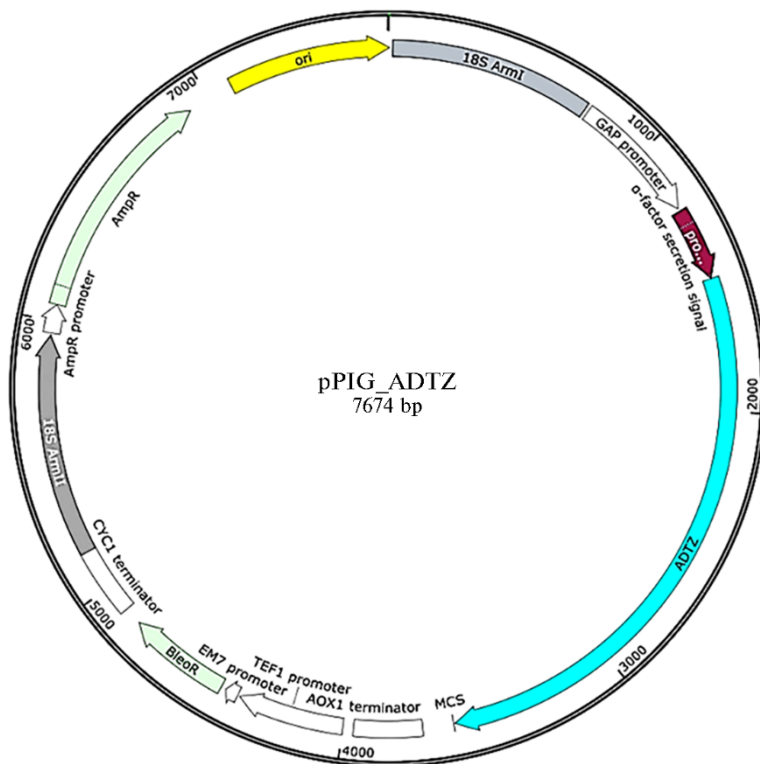


Рис. 2. Карта плазмиды pPIG-ADTZ, полученной при клонировании последовательности синтезированного гена афлатоксин-детоксифизима (ADTZ) *adtz* (*synthetic\_ADTZ*) в вектор pPIG-1.

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 содержат 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  $78 \pm 3$  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.

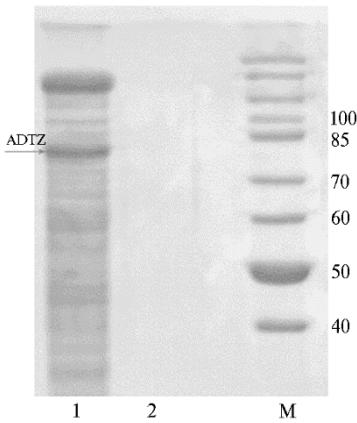


Рис. 3. Электрофореграмма белков культуральной жидкости штамма *Pichia pastoris* ADTZ-14 (1), трансформированного рекомбинантным вектором rPIG-ADTZ с синтезированным геном афлатоксин-детоксифизима (ADTZ) *adtz*, и реципиента *P. pastoris* GS115 (2); М — маркер молекулярной массы PageRuler™ 26614 («Thermo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

Сравнение кинетики деградации АФВ<sub>1</sub> и АФГ<sub>1</sub> в КЖ *P. pastoris* ADTZ-14 показало, что рекомбинантный фермент способен разрушать оба токсина, однако его эффективность в отношении АФВ<sub>1</sub> оказалась значительно выше, чем для АФГ<sub>1</sub>. Так, под действием КЖ продуцента рекомбинантного внеклеточного ADTZ уже через 2 ч инкубации концентрация токсина АФВ<sub>1</sub> снижалась примерно на 14 % по сравнению с исходной, в то время как для АФГ<sub>1</sub> снижение составило лишь 4 % (рис. 4).

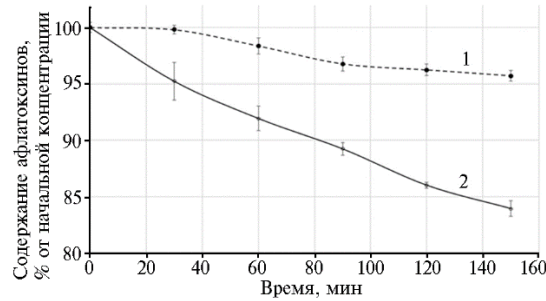


Рис. 4. Кинетика деградации афлатоксинов G<sub>1</sub> (1) и В<sub>1</sub> (2) в бесклеточной культуральной жидкости штамма *Pichia pastoris* ADTZ-14, трансформированного рекомбинантным вектором rPIG-ADTZ с синтезированным геном афлатоксин-детоксифизима (ADTZ) *adtz*, при 40 °С и pH 6,7 ( $n = 3$ , 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

Полученные результаты соответствовали данным других авторов, отмечавших высокую специфичность внутриклеточного ADTZ из *A. tabescens* в отношении АФВ<sub>1</sub> (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.

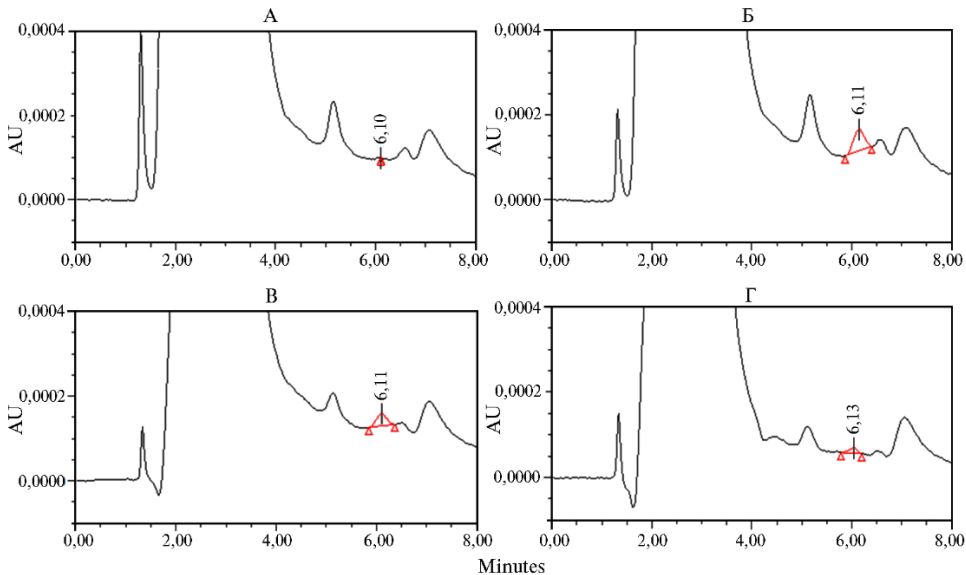


Рис. 5. Хроматограммы образцов культуральной жидкости (КЖ) *Pichia pastoris* (инкубация при

30 °C и pH 7,0).

А: КЖ нетрансформированного рецепиентного штамма GS115 (контроль).

Б: КЖ GS115 + афлатоксин В<sub>1</sub> (АФВ<sub>1</sub>, 1 мкг/мл) после инкубации (контрольный образец). Пик на хроматограмме соответствует 10 нг АФВ<sub>1</sub> во введенной пробе.

В и Г: КЖ штамма *P. pastoris* ADTZ-14, трансформированного рекомбинантным вектором rPIG-ADTZ с синтезированным геном афлатоксин-детоксифизима (ADTZ) *adtz*. + АФВ<sub>1</sub> (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 В<sub>1</sub> (АФВ<sub>1</sub>) 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 <sub>1</sub> , мкг/мл	АФВ <sub>1</sub> , мкг/мл	деградация, %	АФВ <sub>1</sub> , мкг/мл	деградация, %
ADTZ-14	0,97±0,01	0,57±0,06	41,2 <sup>a</sup>	0,19±0,04	80,4 <sup>b</sup>
GS115 (контроль)	0,98±0,01	1,01±0,01	0,0 <sup>c</sup>	0,90±0,05	0,1 <sup>c</sup>

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

<sup>abc</sup> 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 АФВ<sub>1</sub> (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  $\alpha$ -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 АФВ<sub>1</sub> рекомбинантным ADTZ, дополнительной проверке воздействия этого рекомбинантного фермента на другие афлатоксины, а также эксперименты по обработке ферментным препаратом растениеводческой продукции, загрязненной АФВ<sub>1</sub>. 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 АФВ<sub>1</sub>. При этом была осуществлена трансформация дрожжевых клеток плазмидой pPIG-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 АФВ<sub>1</sub> 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 АФВ<sub>1</sub> 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.

<sup>1</sup>ФГБНУ 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 ✉;

Поступила в редакцию  
20 сентября 2022 года

<sup>2</sup>ФГУ 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

*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<sup>1, 2</sup>, I.N. Zorov<sup>2</sup>, Yu.A. Denisenko<sup>1, 2</sup>, O.D. Mikityuk<sup>1</sup>, A.P. Sinitsyn<sup>1, 2</sup>, L.A. Shcherbakova<sup>1</sup> ✉

<sup>1</sup>All-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);

<sup>2</sup>Federal 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

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

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

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

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

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/agrobiol.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 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>). Saving the functional properties of the recombinant protein was shown using experiments on assessment of its ability to degrade AFB<sub>1</sub> during short-time and prolonged incubation. The obtained protein was able to degrade AFB<sub>1</sub> by 14 % after a 2-h incubation at 40 °C; after 72 and 120 h of incubation at 30 °C, the content of AFB<sub>1</sub> 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 AFB<sub>1</sub>. 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 AFB<sub>1</sub>. 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 AFB<sub>1</sub> incubated in cell-free culture broth at 30 °C and pH 7.0.

Keywords: aflatoxin B<sub>1</sub>, mycotoxins, enzymatic degradation, ADTZ from *Armillaria tabescens*, synthetic *adtz* gene, recombinant proteins, heterologous expression, *Pichia pastoris*.

## REFERENCES

1. Dzhavakhiya V.G., Statsyuk N.V., Shcherbakova L.A., Popletaeva S.B. *Aflatoksiny: ingibirovanie biosinteza, profilaktika zagryazneniya i dekontaminatsiya agroproduksii* [Aflatoxins: biosynthesis inhibition, conatamination prevention and decontamination of agricultural products]. Moscow, 2017 (in Russ.).
2. Coppock R.W., Christian R.G., Jacobsen B.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. Kononenko G.P., Zotova E.V., Burkin A.A. Advances in mycotoxicological research of forage grain crops. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2021, 56(5): 958-967 (doi: 10.15389/agrobiology.2021.5.958eng).
4. Kononenko G.P., Burkin A.A. Toxins of micromycetes in generative organs of plants of the family *Fabacea*. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2021, 56(5): 968-978 (doi: 10.15389/agrobiology.2021.5.968eng).
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 B<sub>1</sub> 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 B<sub>1</sub> 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. Verheecke C., Liboz T., Mathieu F. Microbial degradation of aflatoxin B<sub>1</sub>: 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 B<sub>1</sub> 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., Lalpakkar G.V., Campbell P.M., Scott C., Russell R.J., Oakeshott J.G. Identification and characterization of two families of F<sub>420</sub>H<sub>2</sub>-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 B<sub>1</sub> 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 F<sub>420</sub>H<sub>2</sub>-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 B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> 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 B<sub>1</sub> 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 B<sub>1</sub> (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-detoxifying enzyme 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 B<sub>1</sub> 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 K<sub>m</sub> 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 Armillariella 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. Sinel'nikov I.G., Zorov I.N., Sinityna O.A., Sinityn A.P., Rozhkova A.M. *Integratsionnyy vektor dlya mnogokopinyoy integratsii genov v 18Sr RNK drozhzhey Pichia pastoris. № RU 2752904C1, Mosk. FGU Issledovatel'skiy Tsentr «Osnovy Biotekhnologii» RAN (RF). Zayavl. 02.09.20. Opubl. 11.08.21. Byul. № 23* [A vector for multicopy gene integration into 18Sp RNA of the yeast *Pichia pastoris*. No. RU 2752904C1, Moscow. FGU Research Center «Fundamentals of Biotechnology» RAS (RF). Appl. 09.02.20. Publ. 08.11.21. Bull. № 23] (in Russ.).
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*<sup>TM</sup>, 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 B<sub>1</sub> 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 B<sub>1</sub>-degrading enzyme (TV-AFB<sub>1</sub>D) in engineering *Pichia pastoris* GS115 and application in AFB<sub>1</sub> degradation in AFB<sub>1</sub>-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  $\alpha$ -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).