

Экспрессия рекомбинантного метионинбогатого белка в дрожжах *Pichia pastoris*

Научный руководитель – Румянцев Андрей Михайлович

Григорьева Т.М.¹, Цыганков М.А.², Слепченков А.В.³

1 - Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: caverly.n@mail.ru*; 2 - Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Факультет биотехнологии и промышленной экологии (БПЭ), Москва, Россия, *E-mail: mial.tsygankov@yandex.ru*; 3 - Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: st036274@spbu.ru*

Производство аминокислот является одним из важнейших направлений биотехнологии ввиду их активного применения в пищевой промышленности, ветеринарии и фармацевтике. Наибольший интерес в этой области представляет повышение качества пищевых добавок путём обогащения незаменимыми аминокислотами. К их числу относится метионин, который помимо строительной функции, играет в клетке роль важного клеточного метилирующего агента. Содержание метионина в растительной пище невелико, особенно среди бобовых и злаковых культур [1], поэтому увеличение его содержания в пищевых добавках представляется важной задачей.

Дрожжи *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) нашли широкое применение в фармацевтической и биотехнологической индустрии, зарекомендовав себя как эффективный и безопасный продуцент рекомбинантных белков. Дрожжевые клетки содержат высокие концентрации белков, РНК, липидов, аминокислот и витаминов и могут использоваться как обогащающие пищевые добавки для человека и животных [2]. Благодаря высокому уровню гетерологичной экспрессии возможно синтезировать в дрожжах белки, богатые определенными аминокислотами, в том числе метионином и тем самым увеличить ценность добавок на основе дрожжей.

Целью данной работы является синтез в дрожжах *Pichia pastoris* метионинбогатых белков. Для поиска белков с высоким содержанием метионина нами была написана программа, рассчитывающая процентное содержание интересующей аминокислоты во всех белках протеома конкретного организма. Протеомные данные были взяты из белковой базы данных Uniprot. Были проанализированы протеомы 40 модельных организмов различных филогенетических групп. Результатом работы программы явился ранжированный по содержанию метионина список белков. Наиболее обогащенные метионином белки найдены у покрытосеменных растений, при этом лучшими кандидатами для гетерологичного синтеза в дрожжах оказались запасные белки кукурузы зеины (>20% метионина). Кодирующая последовательности белка дельта-зеина была синтезирована на основе матрицы геномной ДНК кукурузы. Для последующей детекции данного белка антителами к этой последовательности была добавлена последовательность с-тус эпитопа. Данная конструкция была встроена под контроль промотора *GAP1* в плазмиду, содержащую ген устойчивости к зеоцину в качестве селективного маркера. Полученной конструкцией был трансформирован штамм X-33 дрожжей *P. pastoris*. В результате вестерн-блот гибридизации был выявлен успешный синтез дельта-зеина в дрожжах. В результате анализа содержания аминокислот в биомассе дрожжевых клеток было доказано повышенное содержание метионина в штамме-продуценте дельта-зеина по сравнению с контролем.

Работа выполнена при поддержке гранта IRC_2020-2: Научный центр мирового уровня "Агротехнологии будущего" (№ 075-15-2020-922).

Источники и литература

- 1) Gorissen S. et al. Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates // *Amino Acids*. 2018. 50(12):1685-1695.
- 2) Takagi, H. Metabolic regulatory mechanisms and physiological roles of functional amino acids and their applications in yeast // *Biosci Biotechnol Biochem*. 2019. 83. 8. 1449-1462.