






Сравнительная экспрессия рекомбинантной фосфолипазы A2 в *Komagataella phaffii* в зависимости от модификации сигнального пептида альфа-фактора






Денис С. Бытык	¹	bytyak.denis@mail.ru	 0000-0002-4281-2758
Юрий А. Гладченко	²	dngfv5@gmail.com	 0000-0002-5895-9463
Анастасия В. Ряполова	¹	anac142009@yandex.ru	 0000-0002-7784-9892
Ольга С. Корнеева	¹	korneeva-olgas@yandex.ru	 0000-0002-2863-0771
Екатерина А. Мотина	¹	emotina18@mail.ru	 0000-0002-3433-2754

¹ Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия
² ООО Инновационный Центр «Бирюч – новые технологии»

Аннотация. В настоящее время Российский рынок ферментных препаратов фосфолипазы A2 представлен коммерческими препаратами иностранных производителей: Nagase (Япония) и Maxapal (Нидерланды). Однако растущий спрос и необходимость снижения себестоимости производства фосфолипазы A2 требуют разработки новых суперпродуцентов фосфолипазы A2. В связи с чем целью работы является сравнительная экспрессия рекомбинантной фосфолипазы A2 в *Komagataella phaffii* в зависимости от модификации сигнального пептида альфа-фактора. Объектом исследования является дрожжевой штамм-реципиент *Komagataella phaffii* X-33. Исследования проводились в соответствии с общепринятыми нормами и подходами. Для работы использованы гены фосфолипазы A2 из *Streptomyces violaceoruber*. Целевые последовательности синтезированы в компании «Евроген» (Россия) и заклонированы в составе ТЕ-вектора pUC57. В ходе выполнения работы проведена сборка генетических конструкций pPICZaA-Pla2 и PPICZmf4iA-Pla2, содержащих ген фосфолипазы A2 *Streptomyces violaceoruber* под нативным сигналом *a-MF* и его модификацией *mf4i*. Также проведена трансформация дрожжей *Komagataella phaffii* X-33 полученными генетическими конструкциями. В результате проведенных исследований показано, что в среднем достоверных отличий в уровне экспрессии и удельной активности рекомбинантной фосфолипазы A2 метилотрофными дрожжами *K. Phaffii* X-33 при использовании нативного сигнала секреции *a-MF* и его модифицированного варианта *mf4i* не обнаружено. Однако использование фактора секреции *mf4i* позволяет получить более высокую продукцию фосфолипазы A2 у отдельных клонов (трансформантов). Полученные данные указывают на перспективность использования фактора секреции *mf4i* для создания суперпродуцентов ферментов на основе дрожжей *K. Phaffii* X-33.

Ключевые слова: *Komagataella phaffii*, фосфолипаза A2, *Streptomyces violaceoruber*, генная инженерия, биотехнология ферментов, экспрессия, АОХ промотор, сигнальный пептид

Comparative expression of recombinant phospholipase A2 in *Komagataella phaffii* depending on the modification of the alpha-factor signaling peptide

Denis S. Bytyak	¹	bytyak.denis@mail.ru	 0000-0002-4281-2758
Yuri A. Gladchenko	²	dngfv5@gmail.com	 0000-0002-5895-9463
Anastasia V. Ryapolova	¹	anac142009@yandex.ru	 0000-0002-7784-9892
Olga S. Korneeva	¹	korneeva-olgas@yandex.ru	 0000-0002-2863-0771
Ekaterina A. Motina	¹	emotina18@mail.ru	 0000-0002-3433-2754

¹ Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia
² Innovation Center Biryuch-New Technologies

Abstract. Currently, the Russian market of phospholipase A2 enzyme preparations is represented by commercial preparations of foreign manufacturers: Nagase (Japan) and Maxapal (the Netherlands). However, the growing demand and the need to reduce the cost of production of phospholipase A2 require the development of new super-producers of phospholipase A2. In this connection, the aim of the work is to compare the expression of recombinant phospholipase A2 in *Komagataella phaffii* depending on the modification of the alpha-factor signaling peptide. The object of the study is the recipient yeast strain *Komagataella phaffii* X-33. The studies were conducted in accordance with generally accepted norms and approaches. Phospholipase A2 genes from *Streptomyces violaceoruber* were used for this work. The target sequences were synthesized in the company "Eurogen" (Russia) and cloned as part of the TE vector pUC57. In the course of the work, the genetic constructs pPICZaA-Pla2 and PPICZmf4iA-Pla2 containing the *Streptomyces violaceoruber* phospholipase A2 gene were assembled under the native signal *a-MF* and its modification *mf4i*. The transformation of the yeast *Komagataella phaffii* X-33 with the obtained genetic constructs was also carried out. As a result of the conducted studies, it was shown that on average, there were no significant differences in the level of expression and specific activity of recombinant phospholipase A2 in methylotrophic yeast *K. Phaffii* X-33 when using the native *a-MF* secretion signal and its modified version *mf4i*. However, the use of the secretion factor *mf4i* allows for higher production of phospholipase A2 in individual clones. The obtained data indicate the prospects of using the secretion factor *mf4i* to create super-producers of enzymes based on yeast *K. Phaffii* X-33.

Keywords: *Komagataella phaffii*, phospholipase A2, *Streptomyces violaceoruber*, genetic engineering, enzyme biotechnology, expression, AOX promoter, signal peptide

Для цитирования

Бытык Д.С., Гладченко Ю.А., Ряполова А.В., Корнеева О.С., Мотина Е.А. Сравнительная экспрессия рекомбинантной фосфолипазы A2 в *Komagataella phaffii* в зависимости от модификации сигнального пептида альфа-фактора // Вестник ВГУИТ. 2021. Т. 83. № 1. С. 263–269. doi:10.20914/2310-1202-2021-1-263-269

For citation

Bytyak D.S., Gladchenko Yu.A., Ryapolova A.V., Korneeva O.S., Motina E.A. Comparative expression of recombinant phospholipase A2 in *Komagataella phaffii* depending on the modification of the alpha-factor signaling peptide. *Vestnik VGUIT* [Proceedings of VSUET]. 2021. vol. 83. no. 1. pp. 263–269. (in Russian). doi:10.20914/2310-1202-2021-1-263-269

Введение

Фосфолипазы A2 (PLA2) – одни из самых изученных фосфолипаз, представляют собой липолитические ферменты, катализирующие гидролиз ацильной связи sn-2 в молекуле гидрофосфолипида, что ведет к освобождению свободных жирных кислот и лизофосфолипидов [1]. В ряде работ у PLA2 доказаны антибактериальные [2], противовирусные [3–5], противопаразитарные [6, 7], антитромбоцитарные [8], гипотензивные [8], противоопухолевые свойства [9]. Кроме того, PLA2 применяются в одном из важнейших этапов рафинирования масла – его гидратации [10]. Особое место PLA2 занимает в промышленном производстве майонеза при ферментативном гидролизе яичного лецитина до изолецитина. Это обеспечивает более высокую стойкость эмульсии и требуемые реологические характеристики майонеза [11, 12]. В настоящее время на рынке России представлено несколько коммерческих ферментных препаратов рекомбинантной ФЛА2: «Nagase» (Япония), нативный штамм-продуцент *Streptomyces violaceoruber*; «Махарал» (Нидерланды), ФЛА2 поджелудочной железы свиней, штамм-продуцент *Aspergillus niger*. Однако растущие потребности рынка в производстве продуктов питания требуют разработки новых суперпродуцентов PLA2.

Одним из наиболее перспективных продуцентов PLA2 считается представитель метилотрофных дрожжей *Komagataella phaffii* (ранее *Pichia pastoris*). Вид характеризуется высокой скоростью роста, способностью к оптимальному гликозилированию рекомбинантных белков, наличием механизмов эффективной секреции продуцируемых ферментов в культуральную среду, низкой секрецией протеаз и других собственных белков в культуральную среду, наличием регулируемого АОХ-промотора [13, 14].

Ранее Liu et. al. был получен штамм-продуцент рекомбинантной PLA2 на основе *K. phaffii* GS115 с продукцией PLA2 из *St. Violaceoruber* на уровне $34,7 \pm 0,2$ ед./мл [15], что выше, чем у прокариотических штаммов-продуцентов PLA2 *St. violaceoruber* (0,5 ед./мл) и *Escherichia coli* (0,2 ед./мл) [16], однако все же не является достаточным для рентабельного промышленного производства.

Существует целый ряд факторов, определяющих эффективность экспрессии гетерологичных белков, в частности, оптимизация нуклеотидной последовательности целевого гена и повышение его копииности в геноме, оптимизация промотора, выбор сигнального пептида для секретируемых белков [17]. Для секреции гетерологичных белков в *K. phaffii* наиболее эффективен пре-про-пептид α -фактора (α -MF).

В настоящее время α -MF является наиболее широко распространенным сигнальным пептидом для секреции рекомбинантных белков и именно с ним удаётся добиться высокой экспрессии. Для улучшения вывода белка в настоящее время используют также разные модификации α -MF, полученные в результате направленной эволюции аминокислотного состава, мутаций, объединения с другими лидерными белками и т. д. Одним из перспективных вариантов α -MF может быть синтетический mf4i, с которым удалось повысить экспрессию рекомбинантной фитазы более чем в 3 раза относительно нативного альфа-фактора.

Цель работы – сравнение экспрессии PLA2 в *Komagataella phaffii* X-33 при использовании нативного α -MF и модифицированного синтетического сигнального пептида α -MF mf4i.

Материалы и методы

Для работы использованы гены фосфолипазы A2 (Pla2) из *Streptomyces violaceoruber* (патент на изобретение RU 26763210), и модифицированного сигнала α -MF mf4i (GeneBank, No AY145833.1). Ген Pla2 оптимизирован для эффективной экспрессии в *K. phaffii* в соответствии с частотой встречаемости кодонов [18].

Последовательность гена фосфолипазы A2, в соответствии с патентом на изобретение RU 26763210:

```
GATCCAGCAGATAAACCTCAAGTTTT
GGCATCATTCACCCAGACATCCGCATCAT
CCCAGAACGCATGGTTGGCCGCTAACAGA
AACCAATCTGCTTGGGCTGCTTACGAATTT
GATTGGTCTACTGATTTGTGTACTCAAGCT
CCAGATAACCCTTTTGGTTTCCCATTCAAC
ACTGCTTGTGCTAGACATGATTTCCGGTTAC
AGAACTATAAGGCTGCTGGTTCTTTTGAT
GCTAACAAGTCCAGAATTGATTCTGCTTTC
TATGAGGATATGAAGAGAGTCTGCACTGG
TTATACCGGAGAGAAGAACACTGCCTGTA
ATTCCACTGCCTGGACCTACTATCAAGCCG
TAAAAATTTTTTGGT.
```

Целевые последовательности синтезированы в компании «Евроген» (Россия) и клонированы в составе ТЕ-вектора pUC57.

Далее рестрикционно-лигазным методом проводили вставку гена Pla2 в состав векторов экспрессии pPICZalphaA и pPICZA (Invitrogen, USA). Для этого с плазмиды pUC57-Pla2 амплифицировали фрагмент ДНК, соответствующий гену Pla2, праймерами Pla2 for 5' – ATATGAATTTCGCTCCAGCAGATAAACCC-3' и Pla2 rev 5' – ATATGTCTGACTCAACCAAA AATCTTTACG-3' на амплификаторе T100 (BioRad, USA) с помощью полимеразы Phusion (NEB, England). Полученный фрагмент длиной 366 п.о. клонировали в состав векторов pPICZA и

pPICZA по сайтам EcoRI и NotI. Продуктами лигирования трансформировали химически компетентные клетки *Escherichia coli XL10Gold* (Stratagen, USA). Корректность нуклеотидной последовательности гена Pla2 в составе полученных конструкций pPICZalphaA-Pla2 и pPICZA-Pla2 выросших на селективных средах с зеотином (25 мкг/мл) была подтверждена картированием и секвенированием ДНК в компании Евроген (Россия).

Для сборки конструкции pPICZmf4iA-pla2 TA-вектор, содержащий часть гена mf4i, и полученную конструкцию pPICZA-Pla2, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BstBI и XhoI (СибЭнзим, Россия). Очистку целевых фрагментов ДНК проводили в 1% агарозном геле с последующей элюцией набором CleanUp Mini (Евроген, Россия) и лигированием с использованием T4 ДНК-лигазы (СибЭнзим, Россия). Продуктами лигирования трансформированы химически компетентные клетки *E. coli XL10Gold* (Stratagen). Корректность нуклеотидной последовательности гена mf4i в составе полученной плазмиды pPICZmf4iA-Pla2 подтверждали секвенированием.

Генетическая трансформация *K. phaffii*. Далее собранные генетические конструкции pPICZaA-Pla2 и pPICZmf4iA-Pla2 использовали для генетической трансформации штамма *K. phaffii* X-33 (Invitrogen, USA). На каждую трансформацию использовали по 10 мкг плазмид pPICZalphaA-Pla2 и pPICZmf4iA-Pla2, линейаризованных по сайту BstXI в области АОХ-промотора. Трансформация линейаризованными плазмидами штамма *K. phaffii* X-33 осуществлялась согласно протоколу Invitrogen [19]. Отбор трансформантов проводился на среде YPD с зеотином (250 мкг/мл). Экспрессионная кассета, интегрируемая в геном *K. phaffii* представлена на рисунке 1.

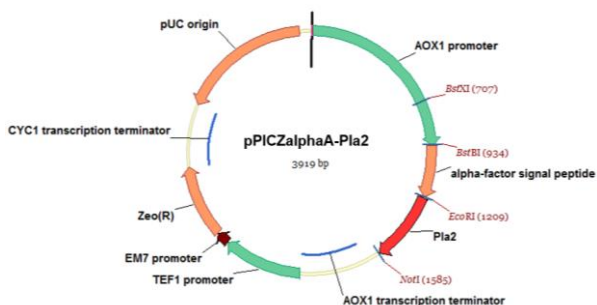


Рисунок 1. Карта вектора экспрессии pPICZalphaA-Pla2
Figure 1. Map of the pPICZalphaA-Pla2 expression vector

Экспрессия PLA2 в *K. phaffii* X-33. Полученные в результате трансформации *K. phaffii* X-33 векторами pPICZalphaA-Pla2 и pPICZmf4iA-Pla2 клоны культивировали в колбах Эрленмейера объемом 100 мл, содержащих по 20 мл среде

YPGM. Культивирование осуществляли в орбитальном термощейкере (BioSan, Латвия) при + 30 °C, 250 об/мин. Каждые 24 часа в среду вносили 1% метанола от объема среды. После культивирования клетки осаждали центрифугированием при 4200 g в течение 5 мин. Супернатант отбирали и использовали для анализа активности фосфолипазы A2. Всего проанализировано по 30 клонов *K. phaffii* с каждым типом сигнала секреции.

Анализ активности PLA2 проводился с использованием кислотно-щелочного метода титрования [15]. Активность PLA2 определялась как количество фермента, требуемое для высвобождения 1 мкг свободной жирной кислоты [20].

Далее образцы культуральной жидкости анализировали методом SDS-электрофореза в 15% ПААГ, а также качественным методом путем нативного электрофореза с последующей инкубацией пластин геля в агаризованном лецитине. по Леммли.

Для определения удельной активности рекомбинантной PLA2 и ферментного препарата «Nagase» проводили очистку фермента на препаративном хроматографе BUCHI на колонке Bio-Rad UNOsphere Q (5 мл). В качестве буфера использовался 40 мМ Трис (pH = 10), в качестве элюента 1 М хлорид натрия в 40 мМ Трис буфере (pH = 10). Оценку активности фосфолипазы A2 в элюате проводили методом кислотно-щелочного титрования, содержание белка определяли по Бредфорду.

Результаты и обсуждение

Получены конструкции pPICZalphaA-Pla2 и pPICZmf4iA-Pla2, проверенные секвенированием на корректность вставки и отсутствие мутаций в генах фосфолипазы A2 и модифицированного сигнала секреции mf4i. Линейаризованными конструкциями проведены трансформации компетентных клеток *K. phaffii* X-33. По 30 выросших на среде YPD с 250 мкг/мл зеотина клонов с каждой конструкцией проиндуцированы при культивировании в жидкой питательной среде YPGM. Полученная культуральная жидкость от клонов проанализирована на наличие PLA2 методом гель-электрофореза в ПААГ (рисунок 2). Исходя из полученных данных, клоны с конструкциями pPICZalphaA-Pla2 и pPICZmf4iA-Pla2 продуцируют PLA2. Как и в работе Liu et. al. [18], нами установлено, что *K. phaffii* экспрессирует три формы PLA2 размером около 13 (A), 16 (B) и 20 (C) кДа. Лишь одна из них соответствует ожидаемому размеру целевой PLA2 в 13,6 кДа. Остальные, вероятно, являются гликозилированными вариантами фермента.

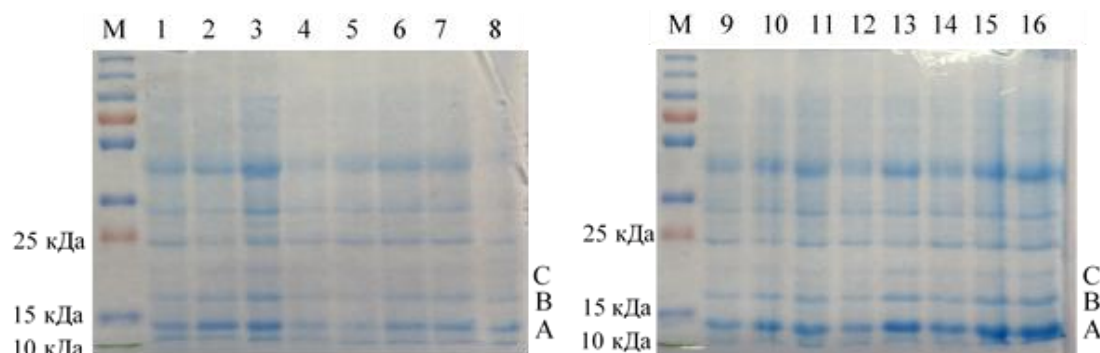


Рисунок 2. Электрофореграмма белков культуральной жидкости клонов с разными вариантами сигнала α -MF. 1–8 – клоны pPICZalphaA-Pla2; 9–16 – клоны pPICZmf4i-Pla2; ABC – формы фосфолипазы A2; M – маркер размера белка

Figure 2. Electrophoregram of proteins of the culture fluid of clones with different signal variants α -MF. 1–8-clones of pPICZalphaA-Pla2; 9–16-clones of pPICZmf4i-Pla2; ABC-forms of phospholipase A2; M-marker of protein size

При этом нативный электрофорез образцов культуральной жидкости с последующим качественным проявлением PLA2 в среде с лецитином показал наличие двух активных форм PLA2 у всех полученных клонов (рисунок 3). Таким образом, одна гликозилированная форма PLA2 является интактной.



Рисунок 3. Результат нативного электрофореза белков культуральной жидкости клонов с разными вариантами сигнала α -MF. 1–4 – клоны pPICZalphaA-Pla2; 5–7 – клоны pPICZmf4i-Pla2

Figure 3. The result of native electrophoresis of proteins of the culture fluid of clones with different signal variants α -MF. 1–4 – clones pPICZalphaA-Pla2; 5–7-clones pPICZmf4i-Pla2

Результаты определения фосфолипазной активности в культуральной жидкости культивированных клонов *K. phaffii* с разными вариантами генетической конструкции приведены в таблице 1. Средний уровень экспрессии PLA2 под фактором mf4i достоверно не отличается от такового в случае нативного сигнала α – MF. Однако экспрессия единичных клонов *K. phaffii* оказалась выше при использовании модифицированного сигнала mf4i, что показано на рисунке 4.

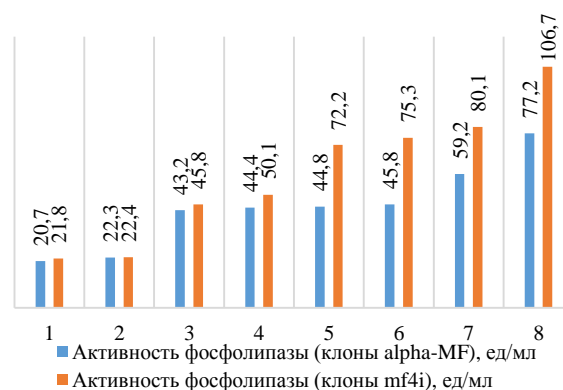


Рисунок 4. Активность фосфолипазы A2 в культуральной жидкости клонов с различными факторами секретиции

Figure 4. Phospholipase A2 activity in the culture fluid of clones with different secretion factors

Таблица 1.
Активность фосфолипазы A2 в культуральной жидкости в зависимости от типа конструкции

Table 1.
Phospholipase A2 activity in the culture fluid, depending on the type of construction

Тип конструкции, трансформированной в <i>K. Phaffii</i> Type of construct transformed in <i>K. phaffii</i>	Средние значения активности PLA2 в культуральной жидкости, ед./мл Average values of PLA2 activity in culture liquid, units/mL	Максимальная активность PLA2 в культуральной жидкости клонов, ед./мл Maximum activity of PLA2 in culture liquid of clones, units/mL
pPICZalphaA-Pla2	44,7 ± 16,2	77,2
pPICZmf4iA-Pla2	59,3 ± 3,6	106,7

Далее была проведена хроматографическая очистка рекомбинантной PLA2 из культуральной жидкости клонов с разными вариантами генетической конструкции, а также ферментного препарата «Nagase». По нашим данным, удельная активность рекомбинантной PLA2, экспрессируемой различными клонами *K. phaffii*, достоверно не различается и составляет 4650 ед./мг. При этом удельная активность PLA2 из ферментного препарата «Nagase», экспрессируемого *St. violaceoruber*, составила 5220 ед./мг.

Таким образом, метилотрофные дрожжи *K. phaffii* вне зависимости от типа сигнала экспрессируют рекомбинантные PLA2 со схожей активностью, сопоставимой с нативным ферментом *St. violaceoruber*.

Заключение

В результате проведенных исследований показано, что в среднем достоверных отличий в экспрессии, удельной активности рекомбинантной PLA2 метилотрофными дрожжами *K. phaffii* X-33 при использовании нативного сигнала секреции α – MF и его модифицированного варианта mf4i не обнаружено. Однако использование фактора секреции mf4i позволяет получить более высокую продукцию PLA2 у отдельных клонов *K. phaffii*.

Модифицированный фактор секреции mf4i имеет более высокий потенциал для экспрессии различных ферментов, что позволяет рассматривать его как перспективный фактор секреции для создания коммерческих экспрессионных систем на основе *K. phaffii* для синтеза гетерологических белков.

Литература

- 1 Dennis E.A., Cao J., Hsu V.I.I., Magriotti V. et al. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention // Chem Rev. 2011. V. 111. P. 6130–6185. doi: 10.1021/cr200085w
- 2 Samy R.P., Gopalakrishnakone P., Stiles B.G., Girish K.S. et al. Snake venom phospholipases A(2): a novel tool against bacterial diseases // Curr Med Chem. 2012. V. 19. P. 6150–6162. doi: 10.2174/092986712804485791
- 3 Muller V.D., Russo R.R., Cintra A.C., Sartim M.A. et al. Crotoxin and phospholipases A2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses // Toxicon. 2012. V. 59. P. 507–515. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.05.021
- 4 Muller V.D., Soares R.O., dos Santos N.N., Trabuco A.C. et al. Phospholipase A2 isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope // PLoS One. 2014. V. 9. №. 11. P. e112351. doi: 10.1371/journal.pone.0112351
- 5 Russo R.R., Müller V.D.M., Cintra A.C.O., Figueiredo L.T.M. et al. Phospholipase A2 crotoxin B isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* exert antiviral effect against dengue virus and yellow fever virus through its catalytic activity // J Virol Antivir Res. 2014. V. 3. P. 1. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.05.021
- 6 Castillo J.C., Vargas L.J., Segura C., Gutiérrez J.M. et al. In vitro antiplasmodial activity of phospholipases A2 and a phospholipase homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* // Toxins (Basel). 2012. V. 4. P. 1500–1516. doi: 10.3390/toxins4121500
- 7 Nunes D.C., Figueira M.M., Lopes D.S., De Souza D.L. et al. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* // Parasitology. 2013. V. 140. P. 844–854. doi:10.1017/S0031182013000012
- 8 Silveira L.B., Marchi-Salvador D.P., Santos-Filho N.A., Silva F.P. et al. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A2 from *Bothrops moojeni* snake venom // J Pharm Biomed Anal. 2013. V. 73. P. 35–43. doi: 10.1016/j.jpba.2012.04.008
- 9 Rodrigues R.S., Izidoro L.F., de Oliveira R.J., Sampaio S.V. et al. Snake venom phospholipases A2: a new class of antitumor agents // Protein Pept Lett. 2009. V. 16. P. 894–898. doi: 10.2174/092986609788923266
- 10 Borrelli G.M., Trono D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications // Int. J.N. Sci. 2015. V. 16. P. 20774–20840. doi: 10.3390/ijms160920774
- 11 Murakami M., Sato H., Miki Y., Yamamoto K. et al. A new era of secreted phospholipase A2 (sPLA2) // J Lipid Res. 2015. V. 56. P. 1248–1261. doi: 10.1194/jlr.R058123
- 12 Quach N.D., Arnold R.D., Cummings B.S. Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. // Biochem Pharmacol. 2014. V. 90. P. 338–348. doi: 10.1016/j.bcp.2014.05.022
- 13 Ahmad M., Hirtz M., Pitcher H., Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous production // Appl Microbiol Biotechnol. 2014. V. 98. P. 5301–5317. doi: 10.1007/s00253-014-5732-5
- 14 Kang Z., Huang H., Zhang Y., Du G. et al. Recent advances of molecular toolbox construction expand *Pichia pastoris* in synthetic biology applications // World J Microbiol Biotechnol. 2017. V. 33. №. 1. P. 1–8. doi: 10.1007/s11274-016-2185-2
- 15 Liu A., Yu X.-W., Sha C., Xu Y. *Streptomyces violaceoruber* Phospholipase A2: expression in *Pichia pastoris*, properties, and application in oil degumming // Appl Biochem Biotechnol. 2015. V. 175. №. 6. P. 3195–3206. doi: 10.1007/s12010-015-1492-7


- 16 Takemori D., Yoshino K., Eba C., Nakano H. et al. Extracellular production of phospholipase A 2 from *Streptomyces violaceoruber* by recombinant *Escherichia coli* // *Protein Expression and Purification*. 2012. V. 81. №. 2. P. 145-150. doi: 10.1016/j.pep.2011.10.002
- 17 Yu X.W., Sun W.H., Wang Y.Z., Xu Y. Identification of novel factors enhancing recombinant protein production in multi-copy *Komagataella phaffii* based on transcriptomic analysis of overexpression effects // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. №. 1. P. 1-12. doi: 10.1038/s41598-017-16577-x
- 18 Codon Usage Database. URL: <http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html>.
- 19 EasySelect *Pichia* Expression Kit. For Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZα in *Pichia pastoris*. User manual // Invitrogen. 2010. 86 p.
- 20 Valli M., Totto N.E., Peymann A., Gruber C. et al. Curation of the genome annotation of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) CBS7435 from gene level to protein function // *FEMS yeast research*. 2016. V. 16. №. 6. doi: 10.1093/femsyr/fow051

References


- 1 Dennis E.A., Cao J., Hsu V.I.I., Magrioti V. et al. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev.* 2011. vol. 111. pp. 6130–6185. doi: 10.1021/cr200085w
- 2 Samy R.P., Gopalakrishnakone P., Stiles B.G., Girish K.S. et al. Snake venom phospholipases A(2): a novel tool against bacterial diseases. *Curr Med Chem.* 2012. vol. 19. pp. 6150–6162. doi: 10.2174/092986712804485791
- 3 Muller V.D., Russo R.R., Cintra A.C., Sartim M.A. et al. Crotoxin and phospholipases A2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. *Toxicon.* 2012. vol. 59. pp. 507–515. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.05.021
- 4 Muller V.D., Soares R.O., dos Santos N.N., Trabuco A.C. et al. Phospholipase A2 isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope. *PLoS One.* 2014. vol. 9. no. 11. pp. e112351. doi: 10.1371/journal.pone.0112351
- 5 Russo R.R., Müller V.D.M., Cintra A.C.O., Figueiredo L.T.M. et al. Phospholipase A2 crotoxin B isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* exert antiviral effect against dengue virus and yellow fever virus through its catalytic activity. *J Virol Antivir Res.* 2014. vol. 3. pp. 1. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.05.021
- 6 Castillo J.C., Vargas L.J., Segura C., Gutiérrez J.M. et al. In vitro antiplasmodial activity of phospholipases A2 and a phospholipase homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxins (Basel).* 2012. vol. 4. pp. 1500–1516. doi: 10.3390/toxins4121500
- 7 Nunes D.C., Figueira M.M., Lopes D.S., De Souza D.L. et al. BnSP 7 toxin, a basic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology.* 2013. vol. 140. pp. 844–854. doi:10.1017/S0031182013000012
- 8 Silveira L.B., Marchi-Salvador D.P., Santos-Filho N.A., Silva F.P. et al. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A2 from *Bothrops moojeni* snake venom. *J Pharm Biomed Anal.* 2013. vol. 73. pp. 35–43. doi: 10.1016/j.jpba.2012.04.008
- 9 Rodrigues R.S., Izidoro L.F., de Oliveira R.J., Sampaio S.V. et al. Snake venom phospholipases A2: a new class of antitumor agents. *Protein Pept Lett.* 2009. vol. 16. pp. 894–898. doi: 10.2174/092986609788923266
- 10 Borrelli G.M., Trono D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *Int. J.N. Sci.* 2015. vol. 16. pp. 20774–20840. doi: 10.3390/ijms160920774
- 11 Murakami M., Sato H., Miki Y., Yamamoto K. et al. A new era of secreted phospholipase A2 (sPLA2). *J Lipid Res.* 2015. vol. 56. pp. 1248–1261. doi: 10.1194/jlr.R058123
- 12 Quach N.D., Arnold R.D., Cummings B.S. Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. *Biochem Pharmacol.* 2014. vol. 90. pp. 338–348. doi: 10.1016/j.bcp.2014.05.022
- 13 Ahmad M., Hirtz M., Pitcher H., Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014. vol. 98. pp. 5301–5317. doi: 10.1007/s00253-014-5732-5
- 14 Kang Z., Huang H., Zhang Y., Du G. et al. Recent advances of molecular toolbox construction expand *Pichia pastoris* in synthetic biology applications. *World J Microbiol Biotechnol.* 2017. vol. 33. no. 1. pp. 1-8. doi: 10.1007/s11274-016-2185-2
- 15 Liu A., Yu X.-W., Sha C., Xu Y. *Streptomyces violaceoruber* Phospholipase A2: expression in *Pichia pastoris*, properties, and application in oil degumming. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015. vol. 175. no. 6. pp. 3195-3206. doi: 10.1007/s12010-015-1492-7
- 16 Takemori D., Yoshino K., Eba C., Nakano H. et al. Extracellular production of phospholipase A 2 from *Streptomyces violaceoruber* by recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification.* 2012. vol. 81. no. 2. pp. 145-150. doi: 10.1016/j.pep.2011.10.002
- 17 Yu X.W., Sun W.H., Wang Y.Z., Xu Y. Identification of novel factors enhancing recombinant protein production in multi-copy *Komagataella phaffii* based on transcriptomic analysis of overexpression effects. *Sci. Rep.* 2017. vol. 7. no. 1. pp. 1-12. doi: 10.1038/s41598-017-16577-x
- 18 Codon Usage Database. URL: <http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html>.
- 19 EasySelect *Pichia* Expression Kit. For Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZα in *Pichia pastoris*. User manual. Invitrogen. 2010. 86 p.
- 20 Valli M., Totto N.E., Peymann A., Gruber C. et al. Curation of the genome annotation of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) CBS7435 from gene level to protein function. *FEMS yeast research.* 2016. vol. 16. no. 6. doi: 10.1093/femsyr/fow051

Сведения об авторах


Денис С. Бытыак магистр, кафедра биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, bytyak.denis@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-4281-2758>


Юрий А. Гладченко генный инженер, Центр биотехнологий, ООО «Инновационный центр «Бирюч-Новые Технологии», Белгородская область, Красногвардейский р-н, с. Малобыково, ул. Белая Вежа, д. 1, 309927, Россия, dngfv5@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0002-5895-9463>


Анастасия В. Ряполова студент, кафедра медицинской биохимии и микробиологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, anac142009@yandex.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-7784-9892>

Ольга С. Корнеева д.б.н., профессор, кафедра биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, korneeva-olgas@yandex.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-2863-0771>

Екатерина А. Мотина к.т.н., доцент, кафедра биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, emotina18@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-3433-2754>

Вклад авторов

Денис С. Бытыак предложил методику проведения эксперимента и организовал производственные испытания.

Юрий А. Гладченко, Анастасия В. Ряполова обзор литературных источников по исследуемой проблеме, проведение эксперимента, выполнение расчётов

Ольга С. Корнеева консультация в ходе исследования


Екатерина А. Мотина написала рукопись, корректировала её до подачи в редакцию и несет ответственность за плагиат

Конфликт интересов


Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about authors


Denis S. Bytyak master student, biochemistry and biotechnology department, Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, bytyak.denis@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-4281-2758>


Yuri A. Gladchenko genetic engineer, Center for Biotechnology, Innovation Center Biryuch-New Technologies, Belgorod Region, Krasnogvardeysky district, Malobykovo village, Belaya Vezha str., 1, 309927, Russia, dngfv5@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0002-5895-9463>


Anastasia V. Ryapolova student, medical biochemistry and microbiology department, Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, anac142009@yandex.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-7784-9892>

Olga S. Korneeva Dr. Sci. (Biol.), professor, biochemistry and biotechnology department, Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, korneeva-olgas@yandex.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-2863-0771>

Ekaterina A. Motina Cand. Sci. (Engin.), biochemistry and biotechnology department, Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19, Voronezh, 394036, Russia, emotina18@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-3433-2754>

Contribution

Denis S. Bytyak proposed a scheme of the experiment and organized production trials

Yuri A. Gladchenko, Anastasia V. Ryapolova review of the literature on an investigated problem, conducted an experiment, performed computations

Olga S. Korneeva consultation during the study

Ekaterina A. Motina wrote the manuscript, correct it before filing in editing and is responsible for plagiarism

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Поступила 18/01/2021	После редакции 16/02/2021	Принята в печать 03/03/2021
Received 18/01/2021	Accepted in revised 16/02/2021	Accepted 03/03/2021