

УДК 577.151.63

АКТИВНОСТЬ НЕЙТРАЛЬНОЙ ФИТАЗЫ ИЗ *Obesumbacterium proteus* В РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММАХ ДРОЖЖЕЙ *Yarrowia lipolytica* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА НИЗКОСОРТНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ СУБСТРАТАХ

© 2019 г. Е. Г. Сердюк¹, Е. П. Исакова¹, Н. Н. Гесслер¹,
Е. В. Трубникова², А. Н. Антипов¹, Ю. И. Дерябина^{1,*}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Курский государственный университет, Курск, 305000 Россия

*e-mail: yul_der@mail.ru

Поступила в редакцию 24.12.2018 г.

После доработки 14.04.2019 г.

Принята к публикации 22.04.2019 г.

Исследовали характеристики рекомбинантной фитазы из *Obesumbacterium proteus* в составе плазмиды *PoIf* (pUV3-Op) в дрожжах *Yarrowia lipolytica*. Показано, что активность фитазы трансформантов проявлялась в широком диапазоне pH 3.5–7.5, сохранялась на уровне 80% при выдерживании при 95°C в течение 3 мин, что позволяло использовать фермент в составе кормов для животных, подвергаемых тепловой обработке. При культивировании трансформантов на низкосортных растительных субстратах выявлялась активность фитазы и наблюдалось увеличение содержания внутриклеточных фосфатов в клетках трансформантов по сравнению с клетками исходного штамма *Y. lipolytica*.

Ключевые слова: фитаты, рекомбинантная фитаза, *Y. lipolytica*

DOI: 10.1134/S055510991905012X

Фитаза (мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфат-фосфогидролаза, КФ 3.1.3.) относится к подклассу фосфатаз, способных расщеплять сложноэфирные связи фосфорной кислоты в молекуле мио-инозитолгексакисфосфорной (фитиновой) кислоты. В зависимости от атома углерода инозитола, с которого начинается гидролиз фосфата, различают: 3-фитазы (КФ 3.1.3.8), 5-фитазы (КФ 3.1.3.72) и 6-фитазы (КФ 3.1.3.26) [1]. Фитазы обнаружены у различных организмов бактерий, грибов, растений, в органах и тканях животных, однако активность этих ферментов у последних крайне мала.

Фитаты представляют собой соли фитиновой кислоты и катионов кальция, магния, железа, калия и др. и являются основными органическими источниками фосфатов в продуктах и кормах растительного происхождения. Отрицательно заряженные остатки фосфатов в молекуле фитиновой кислоты могут взаимодействовать с положительно заряженными группами белков и липидов с образованием трудно растворимых конгломератов, усвоение которых затруднено. Доступность фосфора из фитатов становится возможной только при высвобождении фосфатов под действием

фитаз. Присутствие фитаз в продуктах питания человека или кормах животных не только повышает доступность фосфатов, но и обеспечивает усвоение кальция, магния, железа, а также снижает риск образования комплексов с белками и липидами, недоступных для действия ферментов желудочно-кишечного тракта. Замачивание и проращивание зерна, ферментация растительного сырья с использованием микроорганизмов при приготовлении целого ряда продуктов (хлеб, тофу, темпе, мисо и др.) снижают содержание фитатов за счет действия активных фитаз, присущих растениям или микроорганизмам. Такие предобработки могут обогащать пищу фосфатами и способствуют высвобождению минеральных компонентов из плохо растворимых фитатов. При отщеплении фосфатов от фитиновой кислоты образуется инозитол и его производные, необходимые для создания компонентов липидных мембран [2].

Использование фитаз в качестве обязательных добавок к растительным кормам позволяет снижать нормы внесения минеральных фосфатов в комбикорма свиней, птицы и рыб, необходимых для обеспечения их нормального роста и развития. В свою очередь, снижение добавок фосфатов

животным в виде минеральных солей позволяет уменьшить их выделение и снизить нагрузку на окружающую среду, связанную с загрязнением водоемов и изменением фауны и флоры [1, 3]. Использование высокоэффективных фитаз для восполнения потребности животных в фосфоре за счет фитатов может быть не только экономически выгодным, но и более безопасным с точки зрения экологии [4, 5].

Фитазы разделяют на кислые, нейтральные и щелочные. Кислые фитазы, характерные для бактерий и грибов, проявляют наибольшую активность при pH 2.5–5.5. Ферменты бактерий имеют более высокую удельную активность, большинство из них способны последовательно отщеплять от молекулы фитиновой кислоты до пяти фосфатных остатков, образуя в качестве конечного продукта мио-инозитолмонофосфат. Существенным недостатком бактериальных фитаз является их низкая термостабильность [6].

Степень гидролиза фитатов щелочными фитазами обычно ниже, чем кислыми, но они остаются стабильными при температуре 80–95°C [7]. Условием практического применения фитаз при производстве кормов являются устойчивость к кратковременному (5–10 мин) воздействию высоких температур (70–80°C), используемых в ходе гранулирования комбикормов, высокая удельная активность в физиологических условиях желудочно-кишечного тракта животных (температурный оптимум около 42°C, pH 3–5), а также стабильность при pH 1.5–2.5 и устойчивость к действию протеолитических ферментов. Одними из первых в промышленности начали применяться препараты термостабильных фитаз грибного происхождения, в частности, Файзим (“Danisco Animal Nutrition”, США), Квантум Блу (“AB Vista”, Великобритания) и Ронозим ХайФос (“DSM Nutritional Product”, Нидерланды).

В настоящее время проводятся исследования по получению фитаз с улучшенными характеристиками: с более высокой активностью, проявляющейся в широком диапазоне pH, повышенной термостабильностью и устойчивостью к протеолизу [8]. Фитазы *Obesumbacterium proteus* с молекулярной массой 45 кД, локализованная в периплазматическом пространстве, сходна с фитазой AppA *Escherichia coli*, принадлежащей к тому же семейству *Enterobacteriaceae*, но характеризуется более высокой активностью [9]. По своему строению и свойствам фитаза *O. proteus* относится к группе “бактериальных фитаз” и семейству кислых гистициновых фосфатаз. Активность фермента проявляется при pH 1.5–6.5 с оптимумом при pH 4.9 [10]. Сохранение активности фитазы *O. proteus* в широком диапазоне pH делает этот фермент привлекательным для обогащения кор-

мов, содержащих фитаты, неорганическим фосфатом.

Для получения рекомбинантного фермента в качестве организма-хозяина могут использоваться полиэкстремофильные дрожжи *Yarrowia lipolytica*, обладающие рядом необходимых свойств: способностью расти на органических субстратах самого различного происхождения, способностью к секреции белков и липидов и пищевой безопасностью [11, 12]. Ранее был сконструирован новый рекомбинантный штамм *Y. lipolytica* Po1f (pUV3-Op), продуцирующий инкапсулированную фитазу OPP (*Obesumbacterium proteus* phytase) [13]. Штамм *Y. lipolytica*, был сконструирован на основании вектора pUVLT2 с промотором митохондриального порина VDAC (Voltage Dependent Anion Channel дрожжей) дрожжей *Y. lipolytica*, индукция которого происходит при неблагоприятных условиях [14]. С помощью транскрипционного репортера было показано, что использование этого вектора позволяет добиваться высокоэффективной экспрессии трансгенов в рекомбинантных штаммах *Y. lipolytica*, культивируемых на средах на основе малоценного дешевого сырья. При этом уровень экспрессии трансгена превышал уровень экспрессии под контролем наиболее эффективного из описанных в литературе промоторов – синтетического промотора hr4D. Более того, высокая варибельность профилей экспрессии независимо полученных при трансформации клонов позволяла с помощью фенотипической селекции отбирать трансформанты, обладавшие наибольшей экспрессией на конкретной среде на основе малоценных ингредиентов, имеющей промышленное значение. Термостабильность трансформированной микроинкапсулированной фитазы рекомбинантных штаммов Po1f (pUV3-Op) позволяла использовать фермент для получения кормовых премиксов с применением распылительной сушки.

Цель работы – сравнение активности рекомбинантной фитазы OPP в 22 трансформантах *Y. lipolytica* Po1f (pUV3-Op), изучение термостабильности и зависимости активности фитазы от pH, а также возможности использования трансформантов для гидролиза фитатов при культивировании на низкосортных растительных субстратах.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. В работе использовали штамм экстремофильного вида дрожжей *Y. lipolytica* W 29, полученный из CIRM-Levures Collection (Франция), и трансформанты *Y. lipolytica* PO1f, несущие генетическую конструкцию pUV3-Op [13, 15]. Клонирование гена нейтральной фитазы из *O. proteus* осуществляли с помощью ПЦР на матрице геномной ДНК *O. proteus* ВКПМ-5477 с праймерами OPP-for1 (BamHI) и

OPP-rev1 (NotI), как описано в работе [15]. Введение ДНК конструкции pUV3-Op в клетки *Y. lipolytica* PO1f (MatA, leu2-270, ura3-302, xpr2-322, axp-2) проводилось методом трансформации с использованием солей лития [13]. Штамм депонирован в коллекции CIRM-Levures (Франция) под номером CLIB-724 и в ATCC под номером MYA-2613. Отбор трансформантов проводили на минимальной синтетической среде без урацила с добавлением лейцина при 28°C. В результате отбора было выделено 22 клона.

Культивирование штаммов. Культуры трансформированных дрожжей *Y. lipolytica* поддерживали на агаризованной среде следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт “Difco” (США) – 2.5; бактопептон – 5.0; глюкоза – 10.0; мальт-экстракт – 3; агар – 20.0; pH 5.5.

Жидкая среда YPD для культивирования трансформантов содержала (г/л): дрожжевой экстракт “Difco” (США) – 10.0; глюкоза – 10.0; бактопептон – 20.0 [13].

Среда для выращивания штаммов на растительных субстратах имела следующий состав (г/л): MgSO₄ 7H₂O – 0.5; NaCl – 0.1; CaCl₂ – 0.05; (NH₄)₂SO₄ – 0.3; глюкоза – 10.0; растительный субстрат – 2.0. В качестве растительного субстрата использовали жмых подсолнечника и дробленую кукурузу. Культуры растили в стандартных качалочных колбах на 750 мл на качалке (150 об./мин) при 28°C в течение времени, указанного в эксперименте [13].

Приготовление бесклеточных экстрактов для определения фитазной активности. Клетки дрожжей, выращенные на среде YPD, осаждали центрифугированием при 2000 г в течение 5 мин, дважды промывали холодной дистиллированной водой с последующим центрифугированием. При выращивании культуры на растительных субстратах клетки предварительно отделяли от нерастворимого субстрата фильтрованием через капрон, затем осаждали центрифугированием и промывали дважды холодной водой. Биомассу замораживали в жидком азоте, а затем навеску сухих клеток растирали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния. Разрушенную биомассу смешивали с Na-ацетатным буфером (pH 6.2) в соотношении 1 : 5 и центрифугировали при 12000 г 20 мин. Для дальнейших исследований использовали супернатант.

Оценка фитазной активности с помощью чашечного теста. Тест проводился для первоначального подтверждения наличия активности фитазы в клетках трансформантов. Твердая среда для чашечного теста содержала (в расчете на 1 чашку Петри, $d = 9$ см): 200 мМ трис-ацетатный буфер – 25 мл; агар-агар – 0.25 г; хлористый кальций (5%) – 2.5 мл; фитат натрия “Sigma” – 0.5 г. Фитат натрия и раствор хлористого кальция добавляли после стерилизации в

готовую и охлажденную до 30–40°C агаризованную среду. В застывшей агаризованной среде формировали лунки диаметром 5 мм, в которые вносили по 50 мкл супернатанта. Чашки выдерживали при комнатной температуре 24 ч для появления зон просветления. Активность фитазы оценивали по диаметру зон просветления твердой среды [16].

Определение фитазной активности по методу Грайнера. Метод основан на количественном определении содержания свободных фосфатов, которые после их взаимодействия с гептамолибдатом (парамолибдатом) аммония образовывали фосфоро-молибдат аммония [17]. Реакционная смесь содержала 100 мкл 10 мМ фитата натрия, 250 мкл 100 мМ Na-ацетатного буфера (pH 5.0), 50 мкл раствора фермента. Смесь инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 1.5 мл смеси из свежеприготовленного 10 мМ гептамолибдата аммония, раствора 5 н серной кислоты и ацетона в соотношении 1 : 1 : 2. Оптическую плотность полученных образцов измеряли при 355 нм на спектрофотометре против контроля (1.5 мл смеси 10 мМ гептамолибдата аммония, раствора 5 н серной кислоты и ацетона в соотношении 1 : 1 : 2 и 0.4 мл дистиллированной воды). За единицу активности принимали количество фермента, расщепляющего фитат натрия с образованием 1 мкмоль неорганического фосфата (P_i) за одну мин при 37°C.

Электрофорез в полиакриламидном геле. Нативный электрофорез проводили на пластинах размером 11 × 11 см в градиенте концентрации (5–20%) полиакриламидного геля в трис-НСI буфере, pH 8.8, как описано в работе [18]. Активность фитазы проявлялась в результате образования ортофосфатов натрия при инкубации гелей в течение 16 ч в 0.1 М ацетатном буфере (pH 5.0), содержащем 0.4% фитата натрия. Полосы активности визуализировались путем погружения геля в водный 2%-ный раствор хлорида кобальта. После 5 мин инкубации при комнатной температуре раствор хлорида кобальта заменяли свежеприготовленным раствором, содержащим равные объемы 6.25%-ного водного раствора молибдата аммония и 0.42%-ного раствора ванадата аммония. Присутствие активности фитазы определяли по наличию светлых зон на непрозрачном фоне [19].

Определение свободных фосфатов. Определение фосфатов в супернатанте клеточного гомогената проводили также, как и при определении активности фитазы с гептамолибдатом аммония. Для определения 100 мкл супернатанта смешивали с 300 мкл 100 мМ Na-ацетатного буфера (pH 5.0) и 1.5 мл смеси 10 мМ гептамолибдата аммония, раствора 5 н серной кислоты и ацетона в соотношении 1 : 1 : 2.

Исследование термостабильности фитазы трансформантов. Супернатант клеточного гомогената нагревали в пробирках на водяной бане при температуре 85 и 95°C в течение 2 и 3 мин. По окончании экспозиции пробирку с супернатантом переносили в ледяную баню и далее использовали для определения активности. Результаты выражали в % к активности исходного супернатанта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение фитазной активности в трансформантах дрожжей *Y. lipolytica*. На первом этапе работы был проведен анализ фитазной активности 22 трансформантов *Y. lipolytica* Po1f, несущих генетическую конструкцию (pUV3-Op). Трансформанты выращивали в колбах на качалке (150 об./мин) на жидкой среде YPD при pH 5.5 в течение 24 ч при 28°C. Первичное определение фитазной активности различных трансформантов проводилось на чашках Петри. В качестве негативного контроля выступал исходный штамм *Y. lipolytica* Po1f. Результаты подтвердили наличие активности фитазы в клетках трансформантов с генетической конструкцией pUV3-Op (рис. 1).

Количественное определение фитазной активности по методу Грайнера, основанном на количественном измерении свободных P_i , показало, что наибольшая активность наблюдалась у трансформанта *Y. lipolytica* Po1f (pUV3-Op) под номером 17 ($1.11 \text{ мкмоль } P_i \times \text{мин} \times 1 \text{ г}^{-1}$ сырой биомассы), самая низкая активность – у трансформанта 8 ($0.23 \text{ мкмоль } P_i \times \text{мин} \times 1 \text{ г}^{-1}$ сырой биомассы). У 7 трансформантов активность не превышала $0.45 \text{ мкмоль } P_i \times \text{мин} \times 1 \text{ г}^{-1}$ сырой биомассы, а у 10 трансформантов была в пределах $0.51–0.62 \text{ мкмоль } P_i \times \text{мин} \times 1 \text{ г}^{-1}$ сырой биомассы. По результатам эксперимента для дальнейших исследований были выбраны клоны *Y. lipolytica* Po1f (pUV3-Op) 9; 10; 11; 17 и 22 с наиболее высокой активностью ($0.69–1.11 \text{ мкмоль } P_i \times \text{мин} \times 1 \text{ г}^{-1}$ сырой биомассы).

Электрофоретическая детекция фитазной активности в трансформантах дрожжей *Y. lipolytica*. Присутствие фермента с активностью фитазы было также подтверждено при окрашивании геля после электрофоретического разделения белков супернатанта клеточного гомогената трансформанта 17 *Y. lipolytica* Po1f (pUV3-Op). Культуру дрожжей выращивали на стандартной среде YPD в течение 48 ч. Первоначально окраску геля для выявления фитазной активности проводили по методу, описанному в работе [19], основанному на взаимодействии освобождающегося в ходе реакции P_i с хлоридом кобальта и последующей обработке геля смесью молибдата и ванадата аммония. Метод позволял визуализировать присутствие белков, обладающих фитазной активностью,

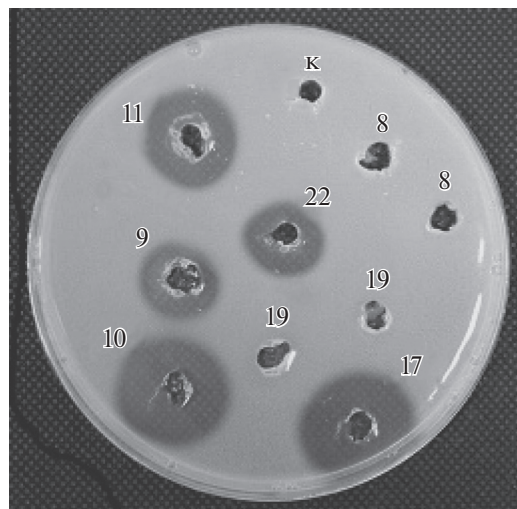


Рис. 1. Оценка активности фитазы OPP в гомогенатах биомассы трансформантов *Y. lipolytica* Po1f (pUV3-Op), несущих интегрированную конструкцию pUV3-Op (цифры соответствуют номерам трансформантов, К – контрольный штамм).

в результате проявления окраски полученного хлорида гексаамминкобальта $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$, водный раствор которого имеет розоватый оттенок. При этом локализацию фермента определяли по положению бесцветной зоны на фоне непрозрачного геля, которая была обусловлена образованием нерастворимых фосфатов кобальта.

При использовании классической методики зона локализации фитазы была плохо различима из-за недостаточной контрастности. Методика была оптимизирована с помощью внесения в реакционную среду соли кобальта. В результате взаимодействия соли кобальта с гидроксидом аммония образовывался гидроксид кобальта, который окрашивал гель в насыщенный сине-зеленый цвет (рис. 2). Зона, в которой образовывался фосфат, проявлялась в виде бесцветного пятна в результате образования нерастворимого комплекса фосфата кобальта. Меняя продолжительность обработки, температуру проявления и концентрацию проявляющего раствора, удалось усилить контрастность зоны проявления активности фитазы и получить сине-зеленую окраску геля с четко различимой зоной локализации фитазы. Наиболее выраженный результат был достигнут при обработке геля в течение 2 ч при комнатной температуре с визуальным контролем хода реакции.

Влияние pH среды культивирования на характеристики трансформантов. Дрожжи *Y. lipolytica* способны расти в широком диапазоне pH от 3.0 до 10.5 [14]. В составе введенной генетической конструкции (pUV3-Op) у полученных трансформантов индуцибельным промотором является ген митохондриального порина VDAC [14], активна-



Рис. 2. Электрофоретический профиль фитазы в ПААГ при проявлении окраски в результате обработки гидроксидом аммония. Ферментный препарат из клеток трансформанта 17 *Y. lipolytica* Po1f (pUV3-Op) наносили в количестве 30 мкг белка.

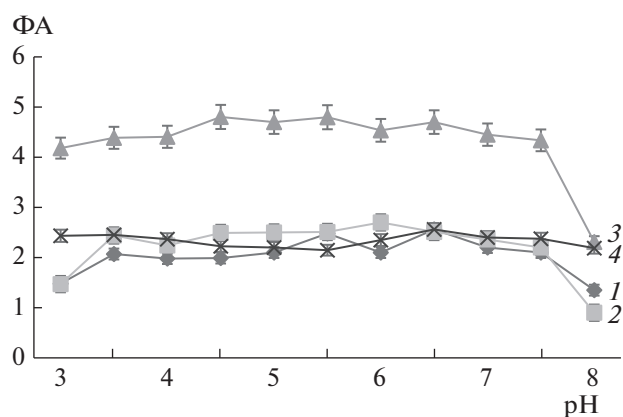


Рис. 3. Зависимость активности внутриклеточной фитазы выделенных трансформантов ($\mu\text{кмоль Р}_i \times \text{мин}^{-1} \times \text{г}^{-1}$ сырой биомассы) от рН. Трансформанты *Y. lipolytica* Po1f (pUV3-Op) – 9 (1), 10 (2), 17 (3), 22 (4).

ция которого в клетках *Y. lipolytica* происходит в стрессовых условиях, в частности, при щелочных рН, введении прооксидантов и т.д. [20]. В дальнейшем поэтому исследовали интенсивность роста и активность фитазы у различных трансформантов *Y. lipolytica* при культивировании на среде с различными значениями рН. Культивирование исходного штамма *Y. lipolytica* на жидкой среде YPD с начальным рН 8.5 в течение 48 ч не вызвало заметного изменения накопления биомассы по сравнению со средой с рН 5.5, тогда как у трансформантов 10 и 17 *Y. lipolytica* Po1f (pUV3-Op) накопление биомассы возрастало в 2 раза. При этом наблюдалось также увеличение активности фитазы в 2 и 1.6 раза у трансформантов 10 и 17 соответ-

ственно. Увеличение активности фитазы подтверждает активацию промоторного гена VDAC в щелочных условиях. Метаболический эффект, связанный с увеличением накопления биомассы у трансформантов, может отражать, по-видимому, как влияние активации усвоения фитатов, так и действие потенциал-зависимого порина VDAC в условиях щелочного стресса.

Определение рН-оптимума действия фитаз у трансформантов. При использовании фитаз в качестве кормовой добавки важным показателем является проявление активности фермента в широком диапазоне рН, и, следовательно, возможность их функционирования в желудочно-кишечном тракте животных. На рис. 3 представлено изменение активности фитазы у трансформантов в зависимости от рН инкубационной среды. Как видно, активность фитазы у трансформантов *Y. lipolytica* Po1f (pUV3-Op) 9, 10, 17 и 22 сохранялась почти на одинаковом уровне в пределах рН от 3.5 до 7.5 (рис. 3). Кроме того, было отмечено сохранение активности у трансформантов 17, 22 *Y. lipolytica* Po1f (pUV3-Op) при рН 3.0. Необходимо подчеркнуть, что сохранение активности фитазы из *O. proteus* как при низких, так и нейтральных рН позволяет рекомендовать применение полученных трансформантов в качестве перспективных кормовых добавок.

Исследование термостабильности фитазы трансформантов. Термостабильность является важной характеристикой фермента, применяемого в качестве добавки в составе кормовых премиксов, так как при получении препарата необходимой стадией является сушка при повышенной температуре. Кроме того необходимым этапом при получении комбинированных кормов является прогревание с целью уничтожения микробных контаминантов, таких как кишечная палочка (*Escherichia coli*), сальмонелла (*Salmonellas* sp.), клостридии (*Clostridium* sp.), стафилококки (*Staphylococcus* sp.), стрептококки (*Streptococcus* sp.) и плесневые грибы.

Как видно из рис. 4, у трансформантов *Y. lipolytica* Po1f (pUV3-Op) 9 и 22 наблюдалось значительное увеличение ферментативной активности (на 18–40% относительно исходных значений) при кратковременном нагревании в течение 2 мин при 85°C. При нагревании ферментного препарата при 95°C в течение 3 мин уровень ферментативной активности сохранялся, а увеличение времени нагревания до 7 мин приводило к значительной потере активности. Активность фитазы трансформанта 10 *Y. lipolytica* Po1f (pUV3-Op) при выдерживании при 50°C в течение 2 мин снижалась на 20%, а при увеличении температуры прогрева до 80, 85 и 95°C (2–3 мин) существенно не изменялась. Нагревание в течение 7 мин при 95°C сопровождалось потерей активности. Фитаза трансформанта 17 не отличалась термостабильно-

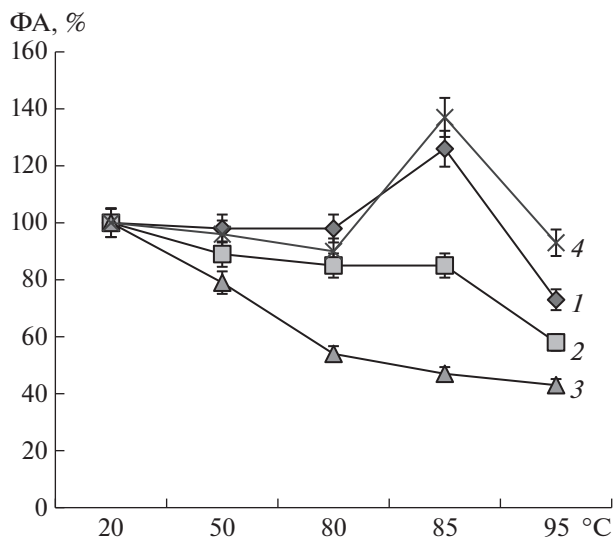


Рис. 4. Изменение активности фитазы (%) в экстрактах клеток трансформантов *Y. lipolytica* PoIf (pUV3-Op) 9 (1), 10 (2), 17 (3), 22 (4) при нагревании. Время нагревания: 2 мин при 50 и 80°C; 3 мин при 85 и 95°C.

стью, поэтому активность после нагревания до 80°C снижалась вдвое и оставалась на этом уровне при увеличении температуры экспозиции до 95°C.

Таким образом, достаточно высокую термостабильность проявляли фитазы трансформантов *Y. lipolytica* PoIf (pUV3-Op) – 9, 10, 22. Анализ термостабильности и pH-зависимости рекомбинантной фитазы из *O. proteus* показал ее преимущество перед рядом других аналогичных ферментов. Так, в работе [21] была исследована характеристика гетерологичной фитазы из *Yersinia intermedia*, синтезируемой *E. coli*. Фермент обладал pH- и температурным оптимумами при 8.0 и 40°C соответственно, что указывает на возможные ограничения его применения в качестве кормовой добавки.

Гранулированный корм подвергается температурному воздействию (до 95°C в течение нескольких мин) [22]. Сравнительное исследование остаточной активности различных коммерческих препаратов фитаз показало, что повышение температуры грануляции от 70 до 90°C вызывало уменьшение активности примерно на 20–30% [22]. Термостабильность выделенных трансформантов 9, 10 и 22 *Y. lipolytica* PoIf (pUV3-Op), полученных для применения в качестве добавок к кормам, достаточно высокая.

Определение внутриклеточной активности фитазы и накопление свободных фосфатов при утилизации низкосортных растительных субстратов. На следующем этапе исследований был проведен анализ активности фитазы и накопления фосфатов в клетках в трансформантов при длительном культивировании на средах, содержащих богатые фитатом грубые растительные субстраты (дробленую кукурузу и жмых подсолнечника). Содержание фитатов в жмыхе подсолнечника составляло 4.3% [23], а в дробленой кукурузе – 0.8–1.1% [24]. При культивировании на среде, содержащей в качестве субстрата жмых подсолнечника, на 2 сут наблюдалось значительное увеличение уровня неорганического фосфата в клетках трансформантов по сравнению с исходным штаммом *Y. lipolytica* (рис. 5 а). Клетки исходного штамма *Y. lipolytica* обладали существенно более низким уровнем свободных фосфатов, который оставался неизменным в течение 7 сут (168 ч) культивирования. На среде с дробленой кукурузой в качестве субстрата содержание фосфатов в клетках было ниже, чем у растущих на жмыхе подсолнечника (рис. 5б). Возможно, более низкий уровень фосфатов при выращивании на дробленой кукурузе по сравнению со жмыхом подсолнечника обусловлен более низким содержанием фитатов в кукурузе.

Результаты определения фитазной активности исследуемых культур при культивировании на среде со жмыхом подсолнечника в качестве суб-

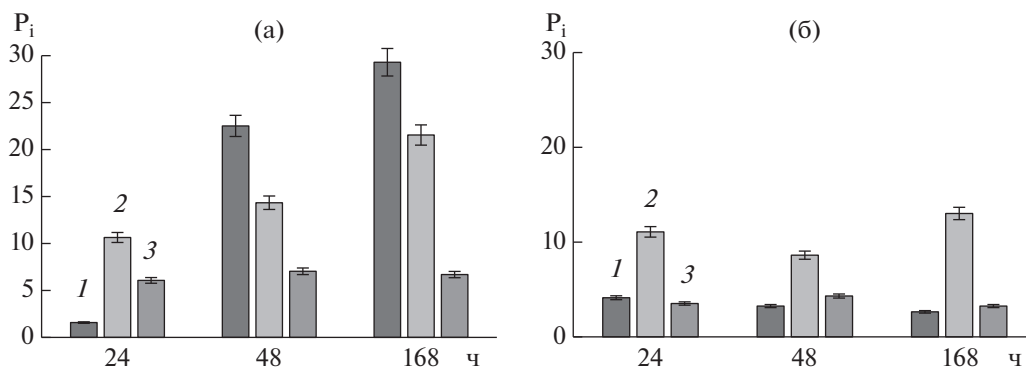


Рис. 5. Накопление свободных фосфатов P_i ($\mu\text{моль} \times 1 \text{ г}^{-1}$ сырой биомассы) в клетках трансформантов 9 (1), 10 (2), 17 (3) и 22 (4) *Y. lipolytica* PoIf (pUV3-Op) при выращивании на жмыхе подсолнечника (а) и дробленой кукурузе (б) в качестве субстрата.

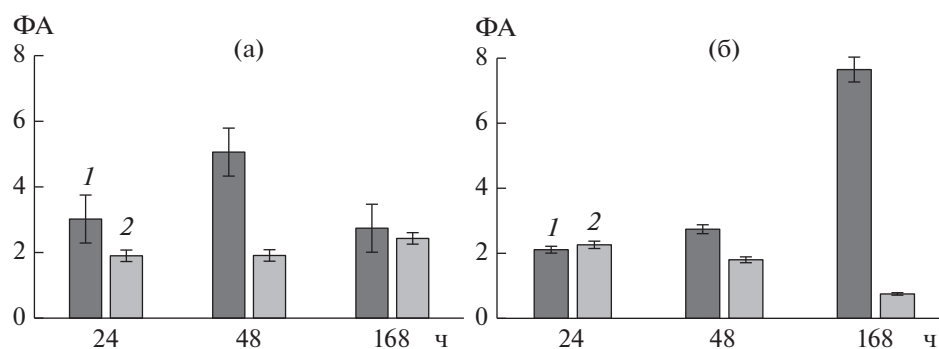


Рис. 6. Активность фитазы (мкмоль $P_i \times \text{мин} \times 1 \text{ г}^{-1}$ сырой биомассы) в клетках трансформантов 17 (1), 22 (2) *Y. lipolytica* PoIf (pUV3-Op) при выращивании на жмыхе подсолнечника (а) и дробленой кукурузе (б) в качестве субстрата.

страта, представленные на рис. 6а, показывают, что активность фитазы у трансформантов наблюдалась на протяжении длительного периода роста, причем трансформант 17 *Y. lipolytica* PoIf (pUV3-Op) проявлял более высокую активность, чем 22 (рис. 6а).

Максимальная фитазная активность наблюдалась у трансформанта 17 *Y. lipolytica* PoIf (pUV3-Op) на 7 сут культивирования на среде с дробленой кукурузой, что превышало активность на среде со жмыхом подсолнечника в качестве субстрата (рис. 6б). Полученные результаты показали, что наибольшая фитазная активность при культивировании на грубых растительных субстратах была получена при использовании трансформанта 17 *Y. lipolytica* PoIf (pUV3-Op).

Для получения высоко термостабильных фитаз обычно используются следующие подходы: 1) поиск термотолерантных ферментов из природных источников; 2) рекомбинантная экспрессия фитаз в различных модельных организмах; 3) молекулярная инженерия известных фитаз и 4) создание термозащитного “покрытия” фермента [24]. Кроме того, важным свойством препаратов фитаз является его способность не терять активность под воздействием рН желудочно-кишечного тракта животных и протеолитической активности пищеварительных ферментов.

Исследуемые в работе трансформанты *Y. lipolytica*, несущие плазмиду pUV3-Op, обладали в разной степени выраженной активностью фитазы, проявляющейся в широком диапазоне рН — от 3.5 до 7.5. Рекомбинантная фитаза сохраняла высокую активность после нагревания препарата при 85–95°C в течение 3 мин. Наличие фитазы было подтверждено специфической окраской фосфатов, выделяющихся в ходе ферментативного расщепления фитата, после электрофоретического разделения внутриклеточных белков. Культивирование различных выделенных клонов *Y. lipolytica*, трансформированных плазмидой pUV3-Op, на фитат-содержащих субстратах сопровождалось увели-

чением внутриклеточного содержания свободных фосфатов по сравнению с исходным штаммом *Y. lipolytica*.

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 40.2713.2017/ПЧ от 31.05.2017 г. и в рамках Государственного задания № 0104-2019-0024.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гесслер Н.Н., Сердюк Е.Г., Исакова Е.П., Дерябина Ю.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 4. С. 1–10.
2. Kumar V., Sinha H., Makkar H.P.S., Becker K. // Food Chem. 2010. V. 120. № 4. P. 945–959.
3. Wodzinski R.J., Ullah A.H.J. // Adv. Appl. Microbiol. 1996. V. 42. № 3. P. 263–302.
4. Prasad C., Mandal A., Gowda N., Sharma K., Pattanaik A., Tyagi P., Elangovan A.V. // Curr. Sci. 2015. V. 108. № 7. P. 1315–1319.
5. Troesch B., Jing H., Laillou A., Fowler A. // Food Nutr. Bull. 2013. V. 34. (2 Suppl). P. 90–101.
6. Ахметова А.И., Мухаметзянова А.Д., Шарипова М.Р. // Ученые записки Казанского университета. 2012. Т. 154. (2) С. 103–110.
7. Azeke M.A., Egielewa S.J., Eigbogbo M.U., Ihimire I.G. // J. Food Sci. Technol. 2011. V. 48. № 6. P. 724–729.
8. Shivange A.V., Schwaneberg U. // Directed Enzyme Evolution: Advances and Application / Ed. M. Alcade. Cham: Springer International Publishing, 2017. P. 145–172.
9. Зинин Н.В., Самсонов В.В., Самсонов В.В., Борщевская Л.Н., Каниковская А.А., Гудима М.Ю., Синевский С.П. // Биотехнология. 2003. № 2. С. 3–10.
10. Zinin N.V., Serkina A.V., Gelfand M.S., Shevelev A.B., Sineoky S.P. // FEMS Microbiol. Lett. 2004. V. 236. № 3. P. 283–290.
11. Liu H.H., Ji X.J., Huang H. // Biotechnol. Adv. 2015. V. 33. № 8. P. 1522–1546.
12. Ledesma-Amaro R., Nicaud J.M. // Trends Biotechnol. 2016. V. 34. № 10. P. 798–809.
13. Исакова Е.П., Сердюк Е.Г., Гесслер Н.Н., Трубникова Е.В., Бирюкова Ю.К., Эпова Е.Ю., Дерябина Ю.И.,

- Николаев А.В. // Докл. АН. 2018. Т. 481. № 3. С. 329–332.
14. Ерова Е.У., Валюнева М.В., Исакова Е.Р., Кудыкина Ю.К., Зылкова М.В., Дерыбина Ю.И., Шеверев А.В. // Biotechnol. Bioprocess Eng. 2016. V. 21. № 3. P. 408–413.
15. Сердюк Е.Г., Исакова Е.П., Гесслер Н.Н., Антипов А.Н., Дерябина Ю.И. // Бюллетень науки и практики. 2018. Т. 4. № 10. С. 18–30.
16. Гордеева Т.Л., Борщевская Л.Н., Калинина А.Н., Си-неокий С.П., Воронин С.П., Каширская М.Д. // Биотехнология. 2017. Т. 33. № 6. С. 83–88.
17. Сулейманова А.Д., Тойменцева А.А., Михайлова Е.О., Шарипова М.Е. // Вестник Казанского университета. 2013. Т. 16. № 20. С. 188–192.
18. Davis J.B. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1964. V. 121. № 3. P. 404–427.
19. Bae H.D., Yanke L.J., Cheng K.-J., Selinger L.B. // J. Microbiol. Methods. 1999. V. 39. № 1. P. 17–22.
20. Куланбаева Ф.Ф., Секова В.Ю., Исакова Е.П., Дерябина Ю.И., Николаев А.В. // Доклады АН. 2016. Т. 470. № 4. С. 1–4.
21. Vieira M.S., Pereira V.V., da Cunha Moraes Álvares A., Nogueira L.M., Lima W.J.N., Granjeiro P.A., Gonçalves D.B., Campos-da-Paz M., de Freitas S.M., Galdino A.S. // Recent Pat. Food Nutr. Agric. 2018. . <https://doi.org/10.2174/2212798410666181205114153>
22. Rebello S., Jose L., Sindhu R., Aneesh E.M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 101. № 7. P. 2677–2689.
23. Miller N., Pretorius H.E., du Toit L.J. // Food Chemistry. 1986. V. 21. № 3. P. 205–209.
24. Hídvégi M., Lásztity R. // Periodica Polytechnica Ser. Chem. Eng. 2002. V. 46. № 1–2. P. 59–64.

The Activity of Neutral Phytase from *Obesumbacterium proteus* in Recombinant Strains of the *Yarrowia lipolytica* Yeast under Cultivation Using Low-Cost Substrates

E. G. Serdyuk^a, E. P. Isakova^a, N. N. Gessler^a, E. V. Trubnikova^b, A. N. Antipov^a, and Y. I. Deryabina^{a,*}

^a*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

^b*Kursk State University, Kursk, 305000 Russia*

**e-mail: yul_der@mail.ru*

Received December 12, 2018; revised April 14, 2019; accepted April 22, 2019

The features of recombinant phytase from *Obesumbacterium proteus*, which in the Po1f (pUV3-Op) plasmid was integrated into the *Yarrowia lipolytica* yeast, were studied. The intracellular activity in the *Y. lipolytica* Po1f transformants (pUV3-Or) was confirmed in the plates tests using the method of spectrophotometric determination of the phosphates released during the reaction. The phytase detection in the gel after electrophoresis of transformants proteins was shown. The phytase activity was manifested in a wide pH range – from 3.5 to 7.5. After being heated for 3 min at 95°C the phytase kept its activity at the level of 80% and higher. If the transformants grew on low-cost plant substrates, the phytase activity was rather high and an increase in the intracellular phosphates level was observed compared to the cells of the wild *Y. lipolytica* strain.

Keywords: phytate, recombinant phytase, *Yarrowia lipolytica*