

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ / BIOLOGICAL SCIENCES

УДК 577.218  
AGRIS F30

**АКТИВНОСТЬ ФИТАЗЫ В РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММАХ  
*YARROWIA LIPOLYTICA* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

©Сердюк Е. Г., ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, Россия, lizochkalove@yandex.ua

©Исакова Е. П., SPIN-код: 1736-8167, канд. биол. наук, ФИЦ Биотехнологии РАН,  
г. Москва, Россия, elen\_iss@mail.ru

©Гесслер Н. Н., канд. биол. наук, ФИЦ Биотехнологии РАН,  
г. Москва, Россия, gessler51@mail.ru

©Антипов А. Н., SPIN-код: 5565-7074, канд. биол. наук, ФИЦ Биотехнологии РАН,  
г. Москва, Россия, a\_antipov@hotmail.ru

©Дерябина Ю. И., SPIN-код: 85990143, канд. биол. наук, ФИЦ Биотехнологии РАН,  
г. Москва, Россия, yul\_der@mail.ru

**ACTIVITY PHYTASES IN RECOMBINANT STRAINS *YARROWIA LIPOLYTICA* UNDER  
DIFFERENT CONDITIONS OF CULTIVATION**

©Serdyuk E., Institute of Biochemistry of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russia, lizochkalove@yandex.ua

©Issakova E., Ph.D., Institute of Biochemistry of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russia, elen\_iss@mail.ru

©Gessler N., Ph.D., Institute of Biochemistry of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russia, gessler51@mail.ru

©Antipov A., SPIN-code: 5565-7074, Ph.D., Institute of Biochemistry of the Russian Academy  
of Sciences, Moscow, Russia, a\_antipov@hotmail.ru

©Deryabina Yu., SPIN-код: 85990143, Ph.D., Institute of Biochemistry of the Russian Academy  
of Sciences, Moscow, Russia, yul\_der@mail.ru

*Аннотация.* Проведена селекция клонов рекомбинантного штамма *Yarrowia lipolytica*, продуцирующего инкапсулированную высокотермостабильную фитазу *Obesumbacterium proteus*. Показано, что введение плазмиды pUV3-Op не влияло на параметры роста и развитие трансформантов. Определено, что максимум фитазной активности достигался через 48 часов культивирования и характеризовался широким оптимальным диапазоном значений pH (5,0–7,0). Был исследован рост трансформантов на минимальной среде с использованием малоценного растительного сырья (жмых подсолнечника, пшеничные отруби, дробленая кукуруза) в качестве единственного источника фосфатов. В ходе эксперимента проанализировано накопление биомассы, фитазная активность и морфология трансформантов *Y. lipolytica*. Рост на среде, содержащей жмых подсолнечника, сопровождался высоким уровнем фитазной активности и накоплением биомассы, в то время как культивирование на среде, содержащей дробленую кукурузу в качестве субстрата, обуславливали значительно более низкую концентрацию биомассы и уровень фитазной активности. В клетках трансформантов, выращенных на растительных фитат-содержащих субстратах, наблюдалось 3–4-кратное повышение содержания неорганического фосфата по сравнению с исходным штаммом *Y. lipolytica*. Проведенные исследования позволяют заключить, что протестированный в наших исследованиях трансформированный штамм *Y.*

*lipolytica* Po1f (pUV3-Op) обладает способностью к синтезу фитазы при культивировании на фитат-содержащих средах и может быть использован для получения кормовых добавок.

*Abstract.* The selection of some clones of the recombinant *Yarrowia lipolytica* yeast producing an encapsulated high-temperature phytase of *Obesumbacterium proteus* has been performed. The introduction of the pUV3-Op plasmid affected on neither growth parameters nor development of transformants. The maximum phytase activity was reached after 48 hours of cultivation and showed a wide optimal pH range (5.0–7.0). The growth of transformants in the poor medium using low-value plant raw materials (sunflower meal, wheat middling, crushed corn) as the sole source of phosphates has been studied. During the experiment, biomass accumulation, phytase activity and morphology of the *Y. lipolytica* transformants were tested. Growth in the sunflower meal containing medium was accompanied by a high level of phytase activity and biomass yield while the cultivation in crushed corn containing medium led to significantly lower level of biomass yield and phytase activity. In the cells of transformants grown using the plant phytate-containing substrates the 3–4 fold increase in inorganic phosphate content was observed compared to that in the initial *Y. lipolytica* yeast. This study let us conclude that the transformed *Y. lipolytica* Po1f (pUV3-Op) yeast tested is capable of synthesizing phytase when cultivated in phytate-containing media and can be used to produce fodder additives.

*Ключевые слова:* *Yarrowia lipolytica*, инкапсулированная фитаза, *Obesumbacterium proteus*.

*Keywords:* *Yarrowia lipolytica*, encapsulated phytase, *Obesumbacterium proteus*.

#### *Введение*

Для полноценного роста и развития сельскохозяйственным животным необходим фосфор, основным источником которого является фитат растений. Высвобождение фосфатов осуществляется с участием ферментов фитаз, но доступность фосфора при действии растительных фитаз не превышает 10%. Обработка растительных кормов фитазами микробного происхождения повышает выход продукции без затрат на внесение минеральных фосфатов и уменьшает загрязнение почв и водоемов фосфатами [1].

Однако, обогащение кормов ферментами затрудняется из-за обязательной термической обработки препаратов, что обуславливает необходимость получения фитаз, сохраняющих ферментативную активность после нагревания до +70°C и выше. Кроме того, ферментный препарат должен сохранять высокую удельную активность в условиях желудочно-кишечного тракта животных (температурный оптимум около +42°C, pH 3,0-5,0). Существующие в настоящее время термостабильные ферментные препараты грибного происхождения активны при кислых значениях pH, что делает их неэффективными в кишечнике животных. Удобным подходом для создания ферментных препаратов является метод с использованием репортерного гена инкапсулированной фитазы.

При разработке новых фитазных препаратов необходимо также учитывать безопасность используемых продуцентов. Дрожжи *Yarrowia lipolytica* являются перспективным объектом для создания инкапсулированных фитаз, так как обладают высокой устойчивостью к изменениям значений pH среды культивирования, устойчивы к окислительному стрессу, а также способны к ферментации разнообразного малоценного сырья [2]. Использование фитаз бактериального происхождения позволяет получить препараты с высокой активностью в широком диапазоне значений pH. Однако бактериальные фитазы не обладают достаточной

термостабильностью [3]. В связи с этим представляет большой интерес использование нейтрофильной фитазы из *Obesumbacterium proteus*, сохраняющей ферментативную активность в широком диапазоне значений pH (от 1,5 до 6,5) и температуре +45°C [4]. Создание инкапсулированных рекомбинантных фитаз на основе дрожжевых клеток позволяет повысить терморезистентность ферментного препарата и защитить его от разрушающего действия желудочных ферментов животных. При выборе объекта-хозяина следует учитывать его способность к ферментации различного рода субстратов, а также устойчивость к действию различных стрессовых факторов.

В нашей предыдущей работе [5] описано получение нового рекомбинантного штамма *Y. lipolytica*, продуцирующего инкапсулированную высокотермостабильную фитазу *O. proteus*. Благодаря удалению секреторного лидерного пептида из последовательности гена *OPP*, реализованному при конструировании плазмиды pUV3-Op, продукту придана способность накапливаться в цитоплазме рекомбинантного продуцента, а не секретироваться в среду культивирования. Показано, что по уровню продукции фитазы штамм *Y. lipolytica* PO1f (pUV3-Op) в среднем на 30% уступал секреторному продуценту ВКПМ Y-3852. Также показано, что при кратковременном нагревании дрожжевой биомассы до +70°C активность фитазы уменьшалась не более чем на 27% от исходного. Следовательно, термостабильность инкапсулированного фермента оказалась достаточной для его применения при изготовлении кормов для сельскохозяйственных животных.

Целью представленной работы являлось исследование свойств полученных трансформантов с внутриклеточной локализацией фитазы на основе дрожжей *Y. lipolytica*, в различных условиях культивирования.

#### Материал и методы исследования

**Объект исследования.** Объектом исследования является штамм *Y. lipolytica* PO1f, трансформированный генетической конструкцией pUV3-Op. Клонирование гена нейтрофильной фитазы из *Obesumbacterium proteus* осуществлялось с помощью ПЦР на матрице геномной ДНК *O. proteus* ВКПМ-5477 с праймерами *OPP-for1* (BamHI) и *OPP-rev1* (NotI), как описано в работе [5].

**Культивирование штамма.** Культивирование трансформированных дрожжей *Y. lipolytica* проводили в следующих условиях: твердая среда для культивирования содержала (г/л): дрожжевой экстракт "DIFCO" — 2,5; бактопептон — 5; агар — 20; глицерин — 7,5; мальт-экстракт — 3. pH среды 5,5; твердая среда YPD для культивирования трансформантов содержала (г/л): дрожжевой экстракт-10; агар — 20; глюкоза — 10; пептон — 20; жидкая среда YPD для культивирования трансформантов содержала (г/л): дрожжевой экстракт-10; глюкоза — 10; пептон — 20; минимальная среда для роста на растительных субстратах содержала (г/л): MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O — 0,5; NaCl — 0,1; CaCl<sub>2</sub> — 0,05; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — 0,3; глюкоза — 10; растительный субстрат — 2. В качестве растительного субстрата использовался жмых подсолнечника, дробленая кукуруза, отруби пшеничные. Твердая среда для чашечного теста содержала: трис-ацетатный буфер (200 мМ) — 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 охлажденную трис-агаровую среду.

**Подготовка гомогенатов для определения фитазной активности.** Клетки дрожжей осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 5 мин, дважды промывали холодной дистиллированной водой. Затем биомассу разрушали в жидком азоте. Для получения ферментного препарата разрушенную биомассу смешивали с Na-ацетатным

буфером (рН 6,2) в соотношении 1:5 и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 20 мин. Для исследований использовали супернатант.

*Определение фитазной активности по содержанию свободных фосфатов с образованием фосфорномолибденовокислого аммония по методу Грайнера.* Реакционная смесь содержала 100 мкл фитата натрия (10 мМ), 250 мкл Na-ацетатного буфера (100 мМ, рН 4.5), 50 мкл раствора фермента. Смесь инкубировали в течение 30 мин при температуре +37°C. Реакцию останавливали добавлением 1,5 мл свежеприготовленного гептомолибдата аммония (10 мМ), раствором 5N серной кислоты и ацетоном в соотношении 1:1:2. Измеряли оптическую плотность полученных образцов при длине волны  $\lambda=355$  нм против контроля (1500 мкл реагента и 500 мкл дистиллированной воды). За единицу активности принимали количество фермента, расщепляющего фитат натрия с образованием 1 мкмоль неорганического фосфата ( $P_i$ ) за одну минуту.

*Определение фитазной активности чашечным тестом.* В застывшей твердой среде для чашечного теста пробивали лунки диаметром 5 мм, в которые вносили по 10 мкл гомогената. Чашки выдерживали при комнатной температуре 24 ч. для появления зон просветления. Фитазную активность оценивали по диаметру зон просветления твердой среды [6].

*Оценка фитазной активности методом нативного электрофореза в полиакриламидном геле.* Нативный электрофорез проводили на пластинах размером 11 × 11 см в градиентном полиакриламидном геле (5–20% полиакриламида) в трис-HCl буфере, рН 8,8, как описано в работе [7]. Фитазная активность выявлялась наличием ортофосфатов путем инкубации гелей в течение 16 ч в 0,1 М ацетатном буфере (рН 5,0), содержащем 0,4% (мас./об.) фитата натрия. Полосы активности визуализировались путем погружения геля в водный 2% (мас./об.) раствор хлорида кобальта. После 5-минут инкубации при комнатной температуре раствор хлорида кобальта заменяли свежеприготовленным раствором, содержащим равные объемы 6,25% (мас./об.) водного раствора молибдата аммония и 0,42% (мас./об.) раствора ванадата аммония. Активность фитазы оценивалась как зоны просветления на непрозрачном фоне [8].

*Определение количества белка.* Определение количества белка в экстрактах дрожжей *Y. lipolytica*. Для определения количества белка использовали метод Брэдфорд с Кумасси G-250.

### Результаты и обсуждение

*Определение фитазной активности в трансформантах дрожжей Y. lipolytica.* На первом этапе работы был проведен анализ фитазной активности полученных трансформантов различными методами. Все трансформанты были выращены на жидкой среде YPD при рН 5,5 в течение 24 часов при температуре +28°C. Определение фитазной активности по методу Грайнера, который основан на количественном измерении свободных  $P_i$ , образовавшихся в ходе реакции, показало, что наибольшая активность наблюдалась у трансформанта №17 (1,11 мкмоль  $P_i \times \text{мин} \times 1 \text{ г}^{-1}$  сырой биомассы), самая низкая активность — у трансформанта №13 (0,23 мкмоль  $P_i \times \text{мин} \times 1 \text{ г}^{-1}$  сырой биомассы) (Рисунок 1). У трансформанта №1 была очень низкая скорость роста, поэтому в дальнейшем в исследованиях он не использовался. Остальные трансформанты показали сходные значения активности в диапазоне от 0,37 до 0,52  $P_i \times \text{мин} \times 1 \text{ г}^{-1}$  сырой биомассы (Рисунок 1).



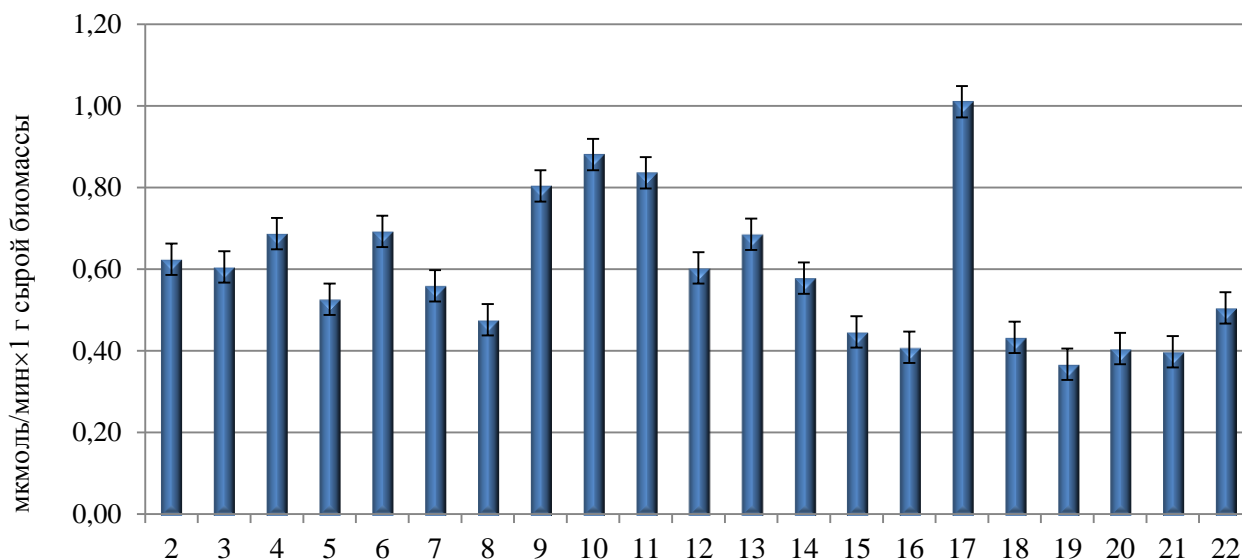


Рисунок 1. Активность фитазы у трансформантов дрожжей штамма *Y. lipolytica* PO1f. Все трансформанты культивировались на среде YPD в течение 24 часов. Цифры на оси абсцисс (2-22) – номера трансформантов. Фитазная активность рассчитывалась в мкмоль  $P_i \times \text{мин} \times 1 \text{ г}^{-1}$  сырой биомассы. Представленные данные получены в результате обчета трех независимых определений. Стандартное отклонение показано для каждого варианта

Для трансформантов, у которых фитазная активность превышала  $0,6 \text{ мкмоль } P_i \times \text{мин} \times 1 \text{ г}^{-1}$  сырой биомассы, был проведен тест на чашках Петри для первичного определения фитазной активности. В качестве негативного контроля выступал исходный штамм *Y. lipolytica* PO1f. (Рисунок 2). По результатам этих первичных тестов для дальнейших исследований были выбраны клоны № 9; 10; 11; 13; 17.



Рисунок 2. Оценка активности фитазы в гомогенатах биомассы трансформантов *Y. lipolytica* PO1f, несущих интегрированную конструкцию pUV3-Op. Зоны просветления вокруг внесенных в лунки гомогенатов трансформантов (30 мкл), сделанные в агаризованной среде с 1%-ным фитатом в качестве источника фосфатов, свидетельствовали о наличии фитазной активности. Фитазную активность трансформантов оценивали в чашечном тесте по диаметру зон просветления суспензии фитата кальция (см. раздел *Материал и методы исследования*)

Для электрофоретического определения фитазной активности использовали ферментный препарат, выделенный из клеток трансформанта №17. Культуру выращивали на стандартной среде YPD в течение 48 часов, ферментный препарат получали путем разрушения клеток трансформантов жидким азотом с последующим центрифугированием для получения клеточного экстракта. Первоначально окраску геля для выявления фитазной активности проводили по методу [8]. Этот метод основан на реакции освобожденного в ходе фитазной реакции  $P_i$  с хлоридом кобальта с последующей обработкой смесью молибдата и ванадата аммония. Присутствие белков, обладающих фитазной активностью, визуализируется при проявлении окраски полученного хлорида гексаамминкобальта ( $[Co(NH_3)_6]Cl_2$ ), водный раствор которого имеет розоватый оттенок. При этом локализацию фермента определяют по положению бесцветной зоны на фоне непрозрачного геля, которая обусловлена образованием нерастворимых фосфатов кобальта. Однако, при применении классической методики зона локализации фитазы оказывалась плохо различима вследствие недостаточной контрастности. На Рисунке 3, А наблюдается слабовыраженная бесцветная зона на бледно-розовом фоне. Методика была оптимизирована за счет внесения в реакционную среду соли кобальта. В результате взаимодействия соли кобальта с гидроксидом аммония образовывался гидроксид кобальта, который окрашивал гель в сине-зеленый цвет (Рисунок 3, Б). Зона, где образовывался фосфат, проявлялась в виде бесцветного пятна, что было обусловлено образованием нерастворимого комплекса фосфата кобальта. Варьируя продолжительность обработки, температуру проявления и концентрацию раствора обработки, удалось усилить контрастность зоны фитазной активности и получить сине-зеленую окраску геля с четко различимой зоной локализации фитазы. (Рисунок 3, Б). Наиболее выраженный результат был достигнут во время обработки геля при комнатной температуре в течение 2 часов, с визуальным контролем хода реакции.

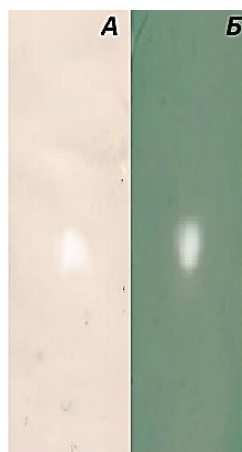


Рисунок 3. Электрофоретический профиль фитазы в ПААГ. А — проявление окраски при обработке смеси молибдата и ванадата аммония. Б — проявление окраски при обработке гидроксидом аммония. Ферментный препарат наносили в количестве 40 мкл на один трек, что соответствовало 30 мкг белка

Ранее при исследовании зависимости фитазной активности от значения рН инкубационной среды, было получено два близких максимума значений активности фитазы (при рН 5,0 и 7,0). Наличие одной зоны просветления на электрофореграмме, позволяет высказать предположение, что выраженной фитазной активностью в клетках трансформантов обладает один фермент.

Исследование зависимости фитазной активности от времени роста культуры. Для отобранных трансформантов была проведена сравнительная оценка их роста на стандартной жидкой среде с использованием колб Эрленмейера и построены кривые роста с расчетом удельной скорости роста ( $\mu$ ), согласно которой выход в стационарную фазу роста наблюдался через 18 часов культивирования (Рисунок 4).

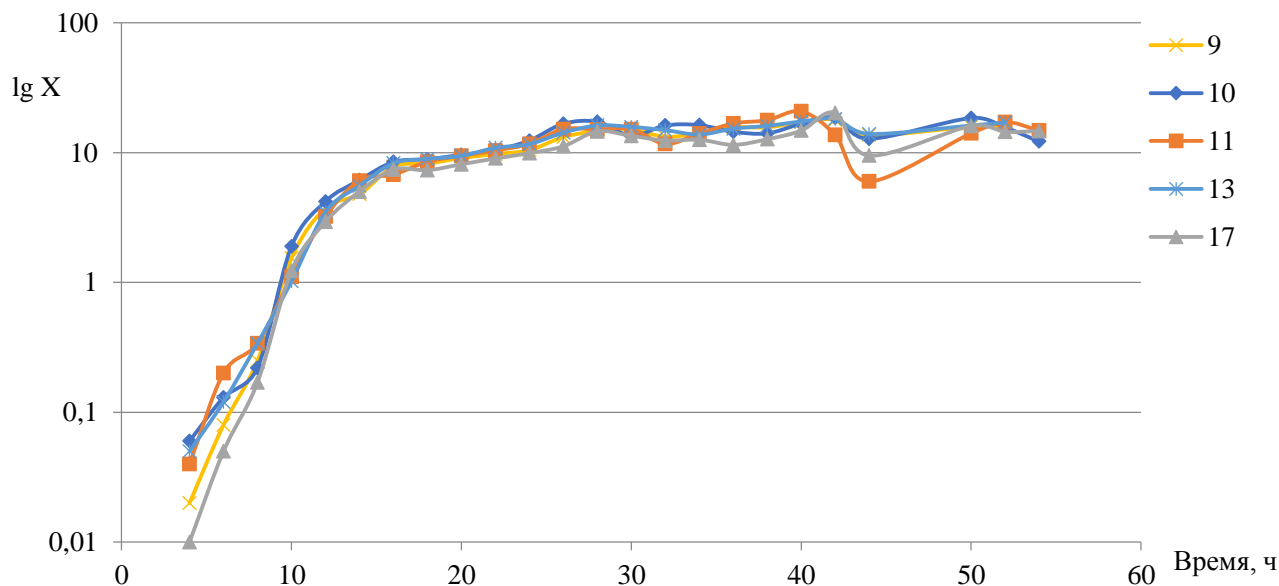


Рисунок 4. Кривые роста культур трансформантов *Y. lipolytica* PO1f в процессе культивирования на среде YPD. Оптическую плотность суспензии определяли при  $\lambda = 590$  нм. 9;10;11;13 и 17 — номера трансформантов. Представлены результаты трех независимых определений

Из Рисунка 4 видно, что рост всех отобранных клонов происходил достаточно равномерно с переходом в стационарную фазу через 16 часов культивирования. Это указывало на то, что введение плазмиды pUV3-Op не влияло на рост и развитие полученных трансформантов. Для экспоненциальной фазы роста была рассчитана удельная скорость роста ( $\mu$ ) и время удвоения клеточной массы ( $g$ ), которые приведены в Таблице.

Таблица.

ПАРАМЕТРЫ РОСТА ТРАНСФОРМАНТОВ *Y. LIPOLYTICA* PO1F

Образец	$\mu, ч^{-1}$	$g, ч$	Время выхода в стационарную фазу роста, ч
Трансформант №9	$0,50 \pm 0,001$	$1,45 \pm 0,05$	16
Трансформант №10	$0,41 \pm 0,02$	$1,74 \pm 0,03$	17
Трансформант №11	$0,43 \pm 0,02$	$1,68 \pm 0,06$	16
Трансформант №13	$0,43 \pm 0,01$	$1,69 \pm 0,06$	16
Трансформант №17	$0,55 \pm 0,01$	$1,31 \pm 0,05$	18

Приведенные данные подтверждают, что накопление биомассы у всех трансформантов происходило с близкими по своим значениями скоростями роста. Это свидетельствовало, по-видимому, о сходстве основных метаболических путей и отсутствии влияния данной плазмиды на скорость роста трансформантов. Далее было проведено исследование изменения фитазной активности трансформантов на разных стадиях роста. Как следует из Рисунка 4, выход в стационарную стадию у всех исследуемых культур наблюдался через 16 часов культивирования. График зависимости активности фитазы от времени и стадии роста,

показывает, что к 24 часам роста наблюдалось некоторое снижение активности у всех трансформантов (Рисунок 5). В ходе дальнейшего роста было отмечено повышение фитазной активности, максимум которой достигался к 48-54 часам роста. Стоит отметить, что активность трансформанта №17 стремительно увеличивалась в стационарной фазе роста, в то время как активность других образцов была существенно ниже. Возможно это связано с активацией промотора VDAC в условиях окислительного стресса, вызываемого истощением основных субстратов.

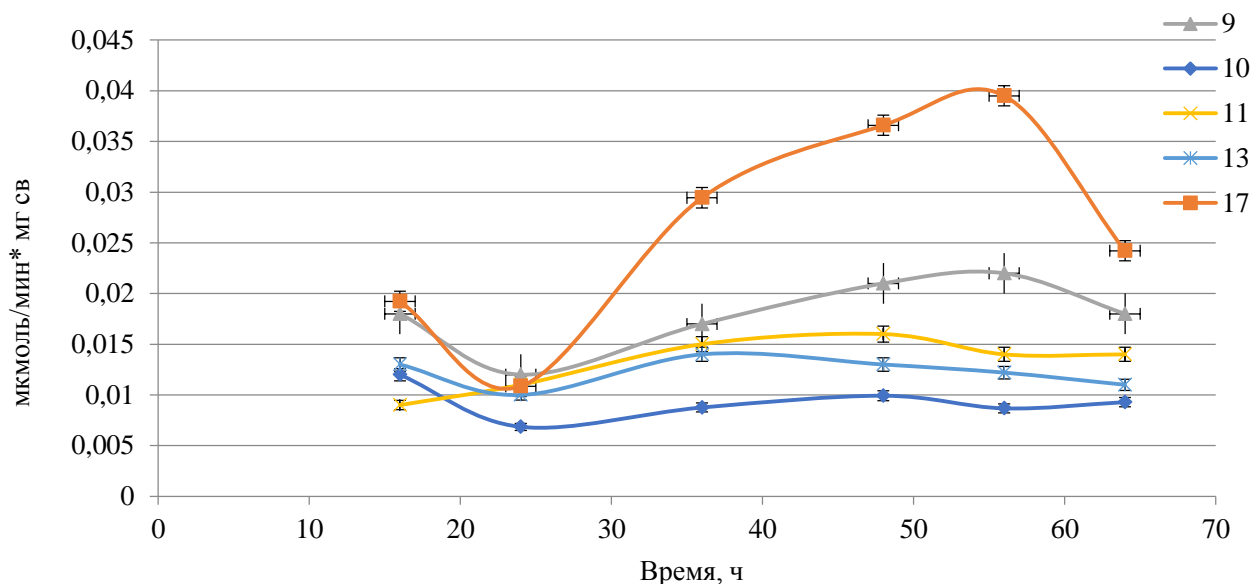


Рисунок 5. Изменение фитазной активности трансформантов в процессе роста культуры на среде YPD. 9; 10; 11; 13 и 17 — номера трансформантов. Представленные данные получены в результате обсева трех независимых определений. Стандартное отклонение показано для каждого варианта

*Исследование фитазной активности при росте трансформантов на растительных субстратах.* Известно, что *Y. lipolytica* способна расти на самых различных растительных субстратах, которые используются в качестве кормов для сельскохозяйственных животных. В настоящей работе была проверена способность полученных трансформантов расти на низкосортных субстратах: жмыхе подсолнечника, дробленой кукурузе, отрубях пшеницы.

На Рисунке 6 представлены микрофотографии клеток трансформантов и исходного штамма *Y. lipolytica*, выращенных на различных субстратах. Как видно из полученных данных, морфология *Y. lipolytica* не претерпевала значительных изменений. При росте трансформантов на растительных субстратах наблюдались некоторые морфологические изменения. Рост на среде, содержащей жмых подсолнечника (2%), вызывал образование псевдомицелия, а при культивировании на других растительных субстратах (дробленой кукурузе и отрубях пшеницы) было зарегистрировано появление веретенообразных клеток. По сравнению с исходным штаммом *Y. lipolytica*, количество клеток трансформантов в 1 мл культуральной жидкости было в 3-4 раза меньше (Рисунок 6).



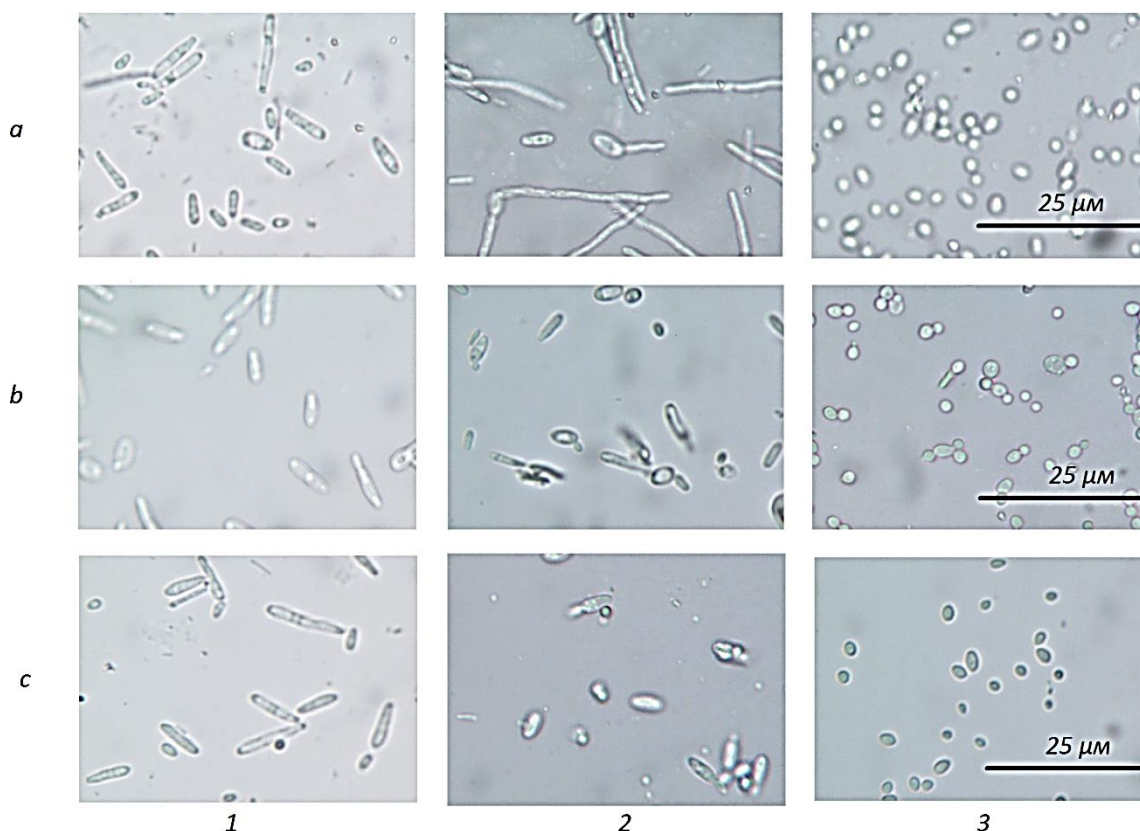


Рисунок 6. Микрофотографии клеток трансформантов и исходного штамма *Y. lipolytica* при росте на различных растительных субстратах: 1 - трансформант №10; 2 – трансформант №17; 3 – исходный штамм *Y. lipolytica*. а – жмых подсолнечника; б – дробленая кукуруза; в – пшеничные отруби. Биомасса дрожжей была собрана в стадии глубокого стационара (48 ч культивирования), разведена в 10 раз и подвергнута микроскопированию при увеличении  $\times 40$

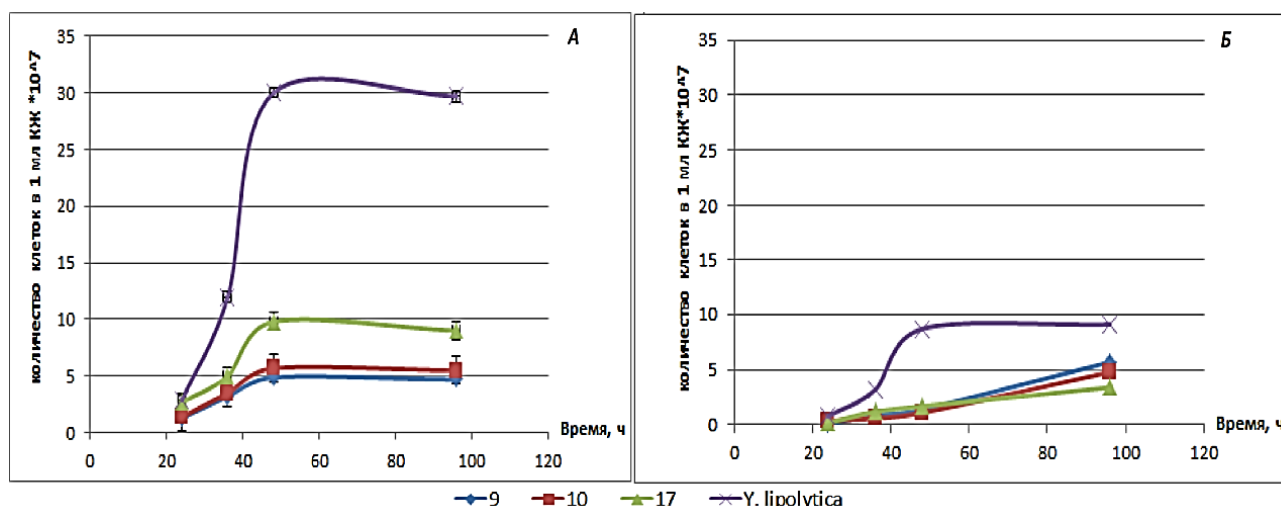


Рисунок 7. Динамика накопления биомассы клеток при росте на средах с различными растительными субстратами: А — жмых подсолнечника; Б – дробленая кукуруза. 9, 10, 17 — номера трансформантов. В качестве контроля использовался исходный штамм *Y. lipolytica*

Как видно из Рисунка 7, все исследуемые культуры на жмыхе подсолнечника росли в 2-3 раза лучше, чем на дробленой кукурузе, что может быть связано с труднодоступностью кукурузы в качестве субстрата. Таким образом, рост на жмыхе подсолнечника сопровождался более высоким уровнем накопления биомассы клеток и, следовательно, обогащением растительного сырья микробным белком, а также повышением ценности кормов.

Далее представлялось целесообразным оценить влияние экстрацеллюлярных фосфатаз на содержание фосфатов в культуральной жидкости при выращивании исследуемых культур на фитат-содержащих средах. Культивирование проводили на жмыхе подсолнечника, дробленой кукурузе и отрубях пшеницы. Для сравнения приведены данные о накоплении фосфатов в культуральной жидкости при росте данных культур на стандартной среде (Рисунок 8). Как следует из полученных результатов, при культивировании на фитат-содержащих средах содержание фосфатов в культуральной жидкости увеличивалось при использовании в качестве субстрата жмыха подсолнечника и отрубей пшеницы, по сравнению со стандартной средой (Рисунок 8). Это свидетельствовало об активации фосфатаз в условиях недостатка фосфатов. Следует отметить, что при культивировании на среде со жмыхом подсолнечника в качестве субстрата наибольшее накопление фосфатов происходило у трансформанта №17. В то же время при культивировании на среде с отрубями пшеницы в качестве субстрата отмечалось увеличение накопления фосфатов в культуральной жидкости *Y. lipolytica*. Низкий уровень накопления фосфатов при росте на среде с дробленой кукурузой согласовался с показанным ранее низким накоплением биомассы на этом субстрате (Рисунок 7, Б).

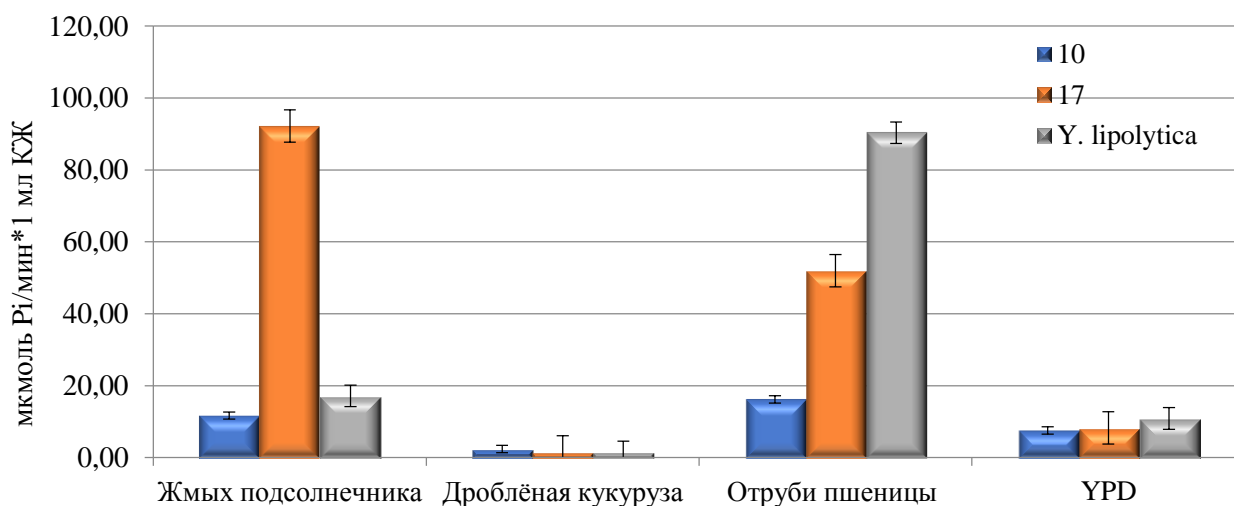


Рисунок 8. Содержание  $P_i$  в культуральной жидкости при росте трансформантов и исходного штамма *Y. lipolytica* на растительных субстратах (стадия глубокого стационара, время культивирования 48 ч). 10; 17 — номера трансформантов. В качестве контроля использовали оценку содержания фосфатов в культуральной жидкости при росте на стандартной среде (время культивирования 48 ч)

В этих условиях была проведена сравнительная оценка активности экстрацеллюлярных фосфатаз трансформантов *Y. lipolytica* (Рисунок 9) Высокий уровень фитазной активности у трансформантов наблюдался при культивировании на стандартной среде. Несколько меньший уровень фитазной активности проявлялся на средах с растительным сырьем в качестве субстрата. На всех испытанных средах уровень фитазной активности у трансформанта №17 был в 2 раза выше. Фитазная активность исходного штамма *Y. lipolytica* была наименьшей и практически не изменялась в зависимости от субстрата.

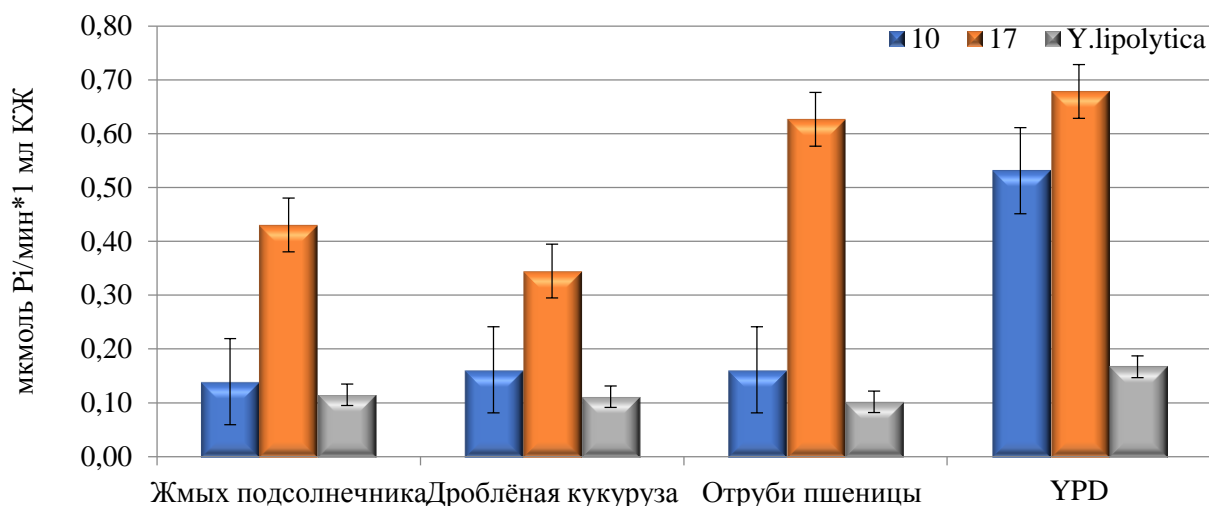


Рисунок 9. Сравнительная активность фитазы в 1 мл культуральной жидкости при росте трансформантов и исходного штамма *Y.lipolytica* на растительных субстратах. 10; 17 — номера трансформантов. Для контроля приведены данные по фитазной активности при росте на стандартной среде (стадия глубокого стационара, время культивирования 48 ч)

Можно предположить, что низкий уровень накопления  $P_i$  в культуральной жидкости при росте на стандартной среде обусловлен более высокой скоростью прироста биомассы и расходом образовавшегося  $P_i$  для обеспечения потребности культуры. Низкое содержание  $P_i$  в культуральной жидкости трансформантов и дикого штамма *Y. lipolytica*, выращиваемых на средах, содержащих дробленую кукурузу в качестве субстрата, наблюдалось несмотря на наличие выраженной фитазной активности. Это можно связать с наличием других факторов, оказывающих ингибирующее действие на рост культуры.

Представленные данные демонстрируют наличие экстрацеллюлярной фитазной активности культуральной жидкости как у трансформантов, так и у исходного штамма *Y. lipolytica*, причем наибольшую фитазную активность проявлял трансформант № 17. Таким образом, культивирование трансформантов, экспрессированных плазмидой pUV3-Op, на фитат-содержащих субстратах сопровождалось увеличением внутриклеточного содержания свободных  $P_i$  по сравнению с исходным штаммом *Y. lipolytica*. Следует отметить, что при росте на жмыхе подсолнечника этот эффект проявлялся у обоих трансформантов, тогда как при росте на дробленой кукурузе — только у трансформанта № 10. Возможно, это связано с различной локализацией плазмиды в геноме. Учитывая вышеприведенные данные, очевидно, что наибольшая фитазная активность получена для трансформанта №17 при его культивировании на жмыхе подсолнечника в течение 48 часов.

#### Заключение

Таким образом, в представленной работе была произведена селекция штаммов-трансформантов полиэкстремофильных дрожжей *Y. lipolytica*, модифицированных плазмидой pUV3-Op с геном инкапсулированной фитазы из *O. proteus*, в качестве промотора в которой был использован ген митохондриального порина VDAC. Полученные трансформанты были проверены на наличие фитазной активности и клоны, которые показали наиболее высокий уровень ферментативной активности, были отобраны для дальнейших исследований. Культивирование трансформантов в различных условиях показало, что введение плазмиды pUV3-Op не влияло на параметры роста и развитие трансформантов. Был исследован рост трансформантов на минимальной среде с использованием малоценного растительного сырья в качестве единственного источника фосфатов. В ходе эксперимента было проанализировано

накопление биомассы, фитазная активность и морфология трансформантов дрожжей *Y. lipolytica*. Рост на среде с субстратом в виде жмыха подсолнечника сопровождался высоким уровнем фитазной активности и накоплением биомассы, в то время как в результате культивирования на среде, содержащей дробленую кукурузу в качестве субстрата, концентрация биомассы была не такой высокой, а уровень активности фитазы значительно не отличался от активности при росте в среде со жмыхом подсолнечника. Предположительно это связано с более высоким уровнем труднодоступности дробленой кукурузы в качестве субстрата.

Таким образом, результатом данной работы является создание продуцента рекомбинантной инкапсулированной фитазы из *O. proteus* на основе дрожжей *Y. lipolytica*, способного к ферментации малоценного растительного сырья в качестве источника фосфатов, который может успешно применяться для получения кормовых добавок для сельскохозяйственных животных.

#### Список литературы:

1. Гесслер Н. Н., Сердюк, Е. Г., Исакова, Е. П., Дерябина, Ю. И. Фитазы и перспективы их применения (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 4. С. 347–356.
2. Madzak C. Engineering *Yarrowia lipolytica* for Use in Biotechnological Applications: A Review of Major Achievements and Recent Innovations // *Molecular Biotechnology*. 2018. P. 1-15. doi: 10.1007/s12033-018-0093-4.
3. Синицына О. А., Федорова Е. А., Гусаков А. В., Упоров И. В., Соколова Л. М., Бубнова Т. М., Окунев О. Н., Чулкин А. М., Винецкий Ю. П., Синицын А. П. Выделение и свойства внеклеточной фитазы *Penicillium canescens* // *Биохимия*. 2006. Т.71. № 9. С. 1260-1268.
4. Zinin N. V. Serkina A. V., Gelfand M. S., Shevelev A. B., Sineoky S. P. Gene Cloning, Expression and Characterization of Novel Phytase from *Obesumbacterium proteus* // *FEMS Microbiol Lett*. 2004. V. 236. N 2. P. 283-90.
5. Isakova E. P., Serdyuk E. G., Gessler N. N., Trubnikova E. V., Biryukova, Y. K., Epova E. Y., Deryabina Y. I., Nikolaev A. V. A New Recombinant Strain of *Yarrowia lipolytica* Producing Encapsulated Phytase from *Obesumbacterium proteus*. // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2018. V. 481. P. 201–204.
6. Гордеева Т. Л., Борщевская Л. Н., Калинина А. Н., Синеокий С. П. и др. Сравнительный анализ эффективности экспрессии генов бактериальных фитаз в дрожжах *Pichia pastoris* с помощью чашечного теста // *Биотехнология*. 2017. Т. 33. № 6. С. 83-88.
7. Davis J.B. Disk electrophoresis II-Method and application to human serum proteins // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1964. V. 121. P. 404–427.
8. Bae H. D., Yanke L. J., Cheng K.-J. Selinger L. B. A novel staining method for detecting phytase activity // *Journal of Microbiological Methods*. 1999. V. 39. P. 17–22.

#### References:

1. Gessler, N. N., Serdyuk, E. G., Isakova, E. P., & Deryabina, Y. I. (2018). Phytases and their Promising Application. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54(4). 347–356.
2. Madzak, C. (2018). Engineering *Yarrowia lipolytica* for Use in Biotechnological Applications: A Review of Major Achievements and Recent Innovations. *Molecular Biotechnology*, 1-15. doi: 10.1007/s12033-018-0093-4.

3. Sinitsyna, O. A., Fedorova, E. A., Gusakov, A. V., Uporov, I. V., Sokolova, L. M., Bubnova, T. M., Okunev, O. N., Chulkin, A. M., Vinetsky, Y. P., & Sinitsyn, A. P. (2006). Isolation and Characterization of Extracellular Phytase a from *Penicillium canescens*. *Biochemistry (Moscow)* 71(9). 1260-1268.

4. Zinin, N. V., Serkina, A. V., Gelfand, M. S., Shevelev, A. B. & Sineoky, S. P. (2004) Gene Cloning, Expression and Characterization of Novel Phytase from *Obesumbacterium proteus*. *FEMS Microbiology Letters*, 236, 283-290.

5. Isakova, E. P., Serdyuk, E. G., Gessler, N. N., Trubnikova, E. V., Biryukova, Y. K., Epova, E. Y., ... & Nikolaev, A. V. (2018). A New Recombinant Strain of *Yarrowia lipolytica* Producing Encapsulated Phytase from *Obesumbacterium proteus*. In *Doklady Biochemistry and Biophysics* (Vol. 481, No. 1, pp. 201-204). Pleiades Publishing.

6. Gordeeva, T. L., Borshchevskaya, L. N., Kalinina, A. N., Sineoky, S. P., Voronin, S. P., & Kashirskaya, M. D. (2017). Comparative Analysis in Plate Test of Expression Efficiency of Genes for Bacterial Phytases in *Pichia pastoris* yeast. *Biotechnology*, 33(6). 83-88. in Russia.

7. Davis, J. B. (1964). Disk electrophoresis II-Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (121). 404-427.

8. Bae, H. D., Yanke, L. J., Cheng, K.-J. & Selinger, L. B. (1999). A novel staining method for detecting phytase activity. *Journal of Microbiological Methods*, (39). 17-22.

Работа поступила  
в редакцию 18.09.2018 г.

Принята к публикации  
23.09.2018 г.

*Ссылка для цитирования:*

Сердюк Е. Г., Исакова Е. П., Гесслер Н. Н., Антипов А. Н., Дерябина Ю. И. Активность фитазы в рекомбинантных штаммах *Yarrowia lipolytica* при различных условиях культивирования // Бюллетень науки и практики. 2018. Т. 4. №10. С. 18-30. Режим доступа: <http://www.bulletennauki.com/serdyuk> (дата обращения 15.10.2018).

*Cite as (APA):*

Serdyuk, E., Issakova, E., Gessler, N., Antipov, A., & Deryabina, Yu. (2018). Activity phytases in recombinant strains *Yarrowia lipolytica* under different conditions of cultivation. *Bulletin of Science and Practice*, 4(10), 18-30. (in Russian).