

УДК 577.151.6

## Сравнительная характеристика фитаз из *Citrobacter freundii* и *Yersinia intermedia*, экспрессированных в метилотрофных дрожжах *Ogataea polymorpha* и *Pichia pastoris*

© 2019 М. Г. ТАРУТИНА<sup>1,\*</sup>, М. Д. КАШИРСКАЯ<sup>2</sup>, М. Н. ЛАЗАРЕВА<sup>1</sup>, А. Р. ЛАПТЕВА<sup>1</sup>, В. Ю. ДОБРЫНИН<sup>2</sup>, Т. Л. ГОРДЕЕВА<sup>1</sup>, С. П. СИНЕОКИЙ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика), Москва, 117545

<sup>2</sup>АО «Биоамид», Саратов, 410033

\*e-mail: m\_tarutina@mail.ru

Поступила в редакцию 09.10.2019 г.

После доработки 05.11.2019 г.

Принята к публикации 15.11.2019 г.

Впервые были экспрессированы гены бактериальных фитаз из *Citrobacter freundii* и *Yersinia intermedia* в термотолерантных дрожжах *Ogataea polymorpha*. Проведен сравнительный анализ свойств рекомбинантных фитаз, продуцируемых дрожжами *O. polymorpha* и *P. pastoris*. Было показано, что стабильность фитаз, рН- и температурный профиль активности ферментов не зависят от штамма-хозяина. Оценена перспективность использования дрожжей *O. polymorpha* для конструирования штаммов-продуцентов кормовых ферментов, фитаз, сохраняющих стабильность в процессе ферментации при температуре >37 °С.

**Ключевые слова:** *Ogataea (Hansenula) polymorpha*, *Pichia pastoris*, метилотрофные дрожжи, термотолерантность, продуцент, рекомбинантная фитаза

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-6-51-56

Фитаза является одним из наиболее востребованных кормовых ферментов. Для промышленного производства фитаз в настоящее время используют высокопродуктивные рекомбинантные штаммы метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* с экспрессируемыми генами фитаз, относящихся к семейству ArrA из класса кислых гистидиновых фосфатаз. Наиболее эффективными для конструирования промышленных продуцентов считаются фитазы PhyCf (*Citrobacter freundii*) и PhyS1 (*Yersinia intermedia*), которые хорошо продуцируются в дрожжах *P. pastoris*, характеризуются высокой удельной активностью и обладают свойствами, оптимальными для их применения в качестве кормовой добавки [1, 2].

Несмотря на популярность дрожжей *P. pastoris* как платформы для продукции гетерологических белков, актуально совершенствование штаммов-продуцентов и технологий с целью сни-

жения себестоимости производства фитаз. Одним из подходов является использование более технологичных экспрессионных систем на основе штаммов термотолерантных метилотрофных дрожжей *Ogataea Hansenula polymorpha*, позволяющих проводить ферментацию при повышенной температуре – более 37 °С. Повышение температуры процесса ферментации снижает контаминацию и затраты на охлаждение биореактора [3] и в результате сокращает длительность ферментации.

Ранее была продемонстрирована эффективность экспрессии в *O. polymorpha* генов фитазы из грибов рода *Aspergillus* [4, 5].

Задача данной работы – оценить перспективность использования фитаз PhyCf и PhyS1 для конструирования рекомбинантных промышленных продуцентов на основе экспрессионной системы дрожжей *O. polymorpha*. Для выполнения

Список сокращений: БРЦ ВКПМ – Биоресурсный центр–Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов; М<sub>1</sub> – молекулярная масса.

задачи необходимо определить температурную и pH-зависимость активности фитаз, их стабильность в культуральной среде при 37 °С (предполагаемой температуре промышленной ферментации) и возможность влияния гликозилирования на удельную активность фитаз.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Штаммы и условия культивирования

В работе использовали штаммы метилотрофных дрожжей *O. polymorpha* ВКПМ Y-2584, *O. polymorpha* ВКПМ Y-4641 (с клонированным геном фитазы PhyCf), *O. polymorpha* ВКПМ Y-4644 (с клонированным геном фитазы PhyS1) и штаммы дрожжей *P. pastoris* ВКПМ Y-4484 (с клонированным геном фитазы PhyCf) и *P. pastoris* ВКПМ Y-4638 (с клонированным геном фитазы PhyS1). Штаммы-продуценты *O. polymorpha* были получены в данной работе. Для клонирования и наработки плазмидной ДНК использовали штамм *E. coli* XL1 blue (Stratagene, США). Штаммы дрожжей и бактерий *E. coli* растили на стандартных средах YPD и LB соответственно.

### Конструирование плазмид

Для экспрессии генов фитаз в штамме *O. polymorpha* ВКПМ Y-2584 использовали сконструированный в данной работе экспрессионный вектор pMOX-Km-HARS (6967 пн). В вектор pBlue-script II KS+ (X52327, Stratagene) с помощью стандартных генно-инженерных методов были последовательно клонированы селективный маркер *KmMX6*, фрагменты ДНК из дрожжей *O. polymorpha*, содержащие промотор и терминатор гена *MOX*, промотор pGAPD гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, HARS и 3'-плечо гена *MOX*, а также сигнальная последовательность MFa *S. cerevisiae* из плазмиды pPIC9a (Invitrogen, США). Карта вектора pMOX-Km-HARS представлена на рис. 1.

Гены фитазы клонировали в экспрессионный вектор pMOX-Km-HARS по сайтам EcoRI и NotI в рамку с сигнальной последовательностью MFa. Гены фитазы *phyCf-mod* и *phyS1-mod* с оптимизацией кодонов для дрожжей *P. pastoris* были синтезированы в НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика по методу, описанному ранее [6]. Нуклеотидные последовательности генов *phyCf-mod* и *phyS1-mod*, кодирующих фитазы PhyCf и PhyS1, приведены на рис. S1 и S2 (Дополнительный материал) соответственно. Ген *phyCf-mod* размером 1236 пн амплифицировали с синтезированной последовательности, используя пары олигонуклеотидов PhyCf-

F (GCGAATTCGAAGAACA AAAATGGTATGAAG) и PhyCf-R (CTAGCGGCCGCTTATCCGTTACTG CACACTC), и полученный фрагмент встраивали в вектор pMOX-Km-HARS по сайтам EcoRI и NotI. Плазмиду назвали pMOX-phyCf (8197 пн). Ген *phyS1-mod* размером 1254 пн амплифицировали с синтезированной последовательности, используя пары олигонуклеотидов PhyS1-F (CAGAA TTCGCACCTGTTGCTATCCAGCC) и PhyS1-R (CTAGCGGCCGCTTAGATGTGGCAGGCTGGCTC), и полученный фрагмент встраивали в вектор pMOX-Km-HARS по сайтам EcoRI и NotI. Плазмиду назвали pMOX-phyYi (8218 пн). Точность всех конструкций подтверждали секвенированием ДНК («Евроген», Россия).

### Трансформация дрожжей *O. polymorpha*

Трансформацию дрожжей *O. polymorpha* осуществляли по методике, описанной в работе [7]. Электропорацию проводили с использованием электропоратора GenePulserXcell™ (Bio-Rad, США) с параметрами: 1500 В, 25 мкФ, 200 Ом. Трансформанты отбирали на чашках со средой YPD с ингибирующей концентрацией генетицина (G418, Gibco by Life Technologies, Великобритания). Чашки инкубировали в термостате при 37 °С в течение двух-трех суток.

### Культивирование рекомбинантных штаммов-продуцентов фитазы

Свежей культурой (одна петля) с селективной среды засеивали 4 мл жидкой среды YP с глюкозой (2%) в пробирках. Пробирки инкубировали при 37 °С и скорости перемешивания 250 об/мин в течение 24 ч. В пробирки с 4 мл жидкой среды YP с глюкозой (2%) переносили 0,4 мл посевной культуры, и инкубировали при 37 °С и 250 об/мин

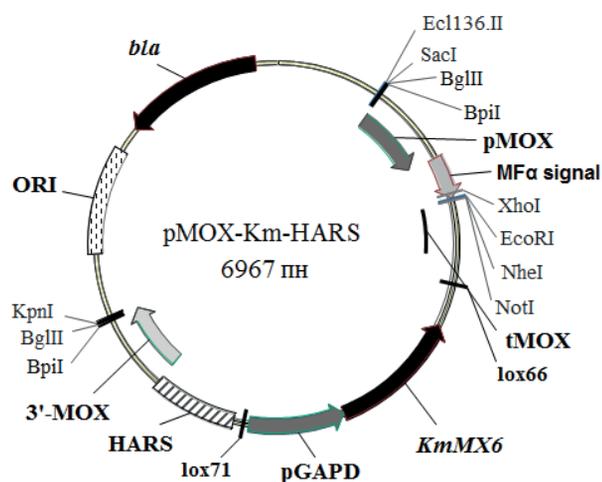


Рис. 1. Схема экспрессионного вектора pMOX-Km-HARS

Fig. 1. Scheme of expression vector pMOX-Km-HARS

в течение 6 сут. Метанол (2%) добавляли к культуре через 24, 48 и 72 ч культивирования. Биомассу отделяли центрифугированием при 6000 об/мин в течение 10 мин. Культуральную жидкость без биомассы (КЖ) использовали для тестирования активности фитазы. По этой же схеме проводили культивирование штаммов-продуцентов фитазы при 30 °С.

#### Анализ ферментативной активности фитазы

Ферментативную активность фитазы в КЖ определяли с использованием ванадиево-молибденового реактива по ГОСТ 31487-2012. За единицу ферментативной активности фитазы принимали количество фермента, катализирующего гидролиз фитата натрия с образованием 1 мкМ неорганического фосфата за 1 мин в стандартных условиях (температура 37 °С, pH 5,5, продолжительность гидролиза 15 мин).

Концентрацию белка определяли с использованием Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay (Pierce, США). Электрофорез белков проводили в 12%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra Bio-Rad (Bio-Rad, США). Для визуализации белков использовали Кумасси бриллиантовый синий R250 или Pierce Silver Stain Kit (Thermo Scientific, США).

Для анализа зависимости ферментативной активности рекомбинантной фитазы от температуры и pH использовали КЖ, полученную после культивирования дрожжей *O. polymorpha* при 37 °С и дрожжей *P. pastoris* при 30 °С. Диапазон исследуемых значений pH составлял 3,5–6,0, а температуры – 35–70 °С. При анализе pH-зависимости ферментативной активности фитазы использовали следующие буферные растворы: 0,1 М глицин-HCl (pH 3,5), 0,1 М NaOAc (pH 4,0–5,5) и 0,1 М трис-HCl (pH 6,0); температурную зависимость определяли в 0,1 М NaOAc (pH 5,5).

Стабильность фермента рассчитывали как остаточную активность после инкубации фермента при температурах 30, 37 и 42 °С в течение 24 ч по отношению к активности фермента в образце, находящемся тот же период времени при 5 °С.

Удельную активность фитазы рассчитывали на общий белок в КЖ, полученной при культивировании штаммов в течение 6 сут в среде YNB с глюкозой (2%) с последующей индукцией метанолом, добавляемым к культуре через 24, 48 и 72 ч ферментации. Дрожжи *O. polymorpha* культивировали при 37 °С, а *P. pastoris* – при 30 °С. Ферментативную активность фитазы в КЖ определяли при NaOAc pH 4,0 и температуре 37 °С с использованием ванадиево-молибденового реактива.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Создание экспрессионной системы на основе дрожжей *Ogataea polymorpha*

Для разработки экспрессионной системы на термотолерантных дрожжах использовали штамм *O. polymorpha* ВКПМ Y-2584, выбранный, исходя из результатов скрининга штаммов термотолерантных дрожжей из БРЦ ВКПМ (Россия). Штамм *O. polymorpha* ВКПМ Y-2584 характеризуется хорошими ростовыми качествами на полной среде с разными источниками углерода (гексозы, пентозы, спирты, включая метанол) при температурах 30 и 37 °С и нейтральных и кислых значениях pH (данные не приведены). Штамм чувствителен к невысоким концентрациям генетицина (G418) (100 мкг/мл) и гигромицина (200 мкг/мл) в среде, что важно при отборе трансформантов.

Для экспрессии генов в метилотрофных дрожжах *O. polymorpha* сконструировали экспрессионный вектор pMOX-Km-HARS (6967 пн (рис. 1). Перед трансформацией вектор pMOX-Km-HARS обрабатывали ферментами BglII или BpiI.

### Клонирование генов фитазы в экспрессионный вектор и отбор наиболее активных штаммов *O. polymorpha* – продуцентов фитазы

Гены фитаз *phyCf-mod* и *phyS1-mod* клонировали в экспрессионный вектор pMOX-Km-HARS в рамку с сигнальной последовательностью MFa. В результате получили плазмиды pMOX-phyCf (8197 пн) и pMOX-phyYi (8218 пн). Аминокислотная последовательность фитазы PhyCf идентична последовательности фитазы *C. freundii* (GenBank: ACZ71725.1). Аминокислотная последовательность PhyS1 идентична последовательности фитазы *Y. intermedia* (GenBank: ABI95370.1).

Штамм *O. polymorpha* ВКПМ Y-2584 трансформировали плазмидой pMOX-phyCf или pMOX-phyYi, которые были обработаны ферментом BglII. Частота трансформации составляла в среднем  $0,5\text{--}1 \times 10^4$  трансформантов на 1 мкг ДНК. Для ферментации было отобрано 12 стабильных трансформантов с геном *phyCf-mod* и 25 трансформантов с геном *phyS1-mod*.

Трансформанты культивировали в пробирках при 37 °С в течение 120 ч после индукции метанолом и измеряли активность фитазы в КЖ. Активность фитаз PhyCf и PhyS1 в КЖ трансформантов составляла от 5,8 до 56,2 ед/мл и от 28 ед/мл до 135,2 ед/мл соответственно.

Два штамма с наибольшей фитазной активностью PhyCf и PhyS1 были депонированы в БРЦ ВКПМ под номерами *O. polymorpha* ВКПМ Y-4641 и *O. polymorpha* ВКПМ Y-4644 соответственно.

### Характеристика фитаз из *C. freundii* и *Y. intermedia*, продуцируемых дрожжами *O. polymorpha* и *P. pastoris*

Штаммы-продуценты фитазы *P. pastoris* ВКПМ Y-4484 (продуцирует PhyCf) и *P. pastoris* ВКПМ Y-4638 (продуцирует PhyS1) были предоставлены для проведения исследования из БРЦ ВКПМ (Москва). Гены фитаз *phyCf-mod* и *phyS1-mod* были клонированы в интегративный экспрессионный вектор рPIC9 $\alpha$  в рамку с сигнальным пептидом MF $\alpha$ . После трансформации дрожжей *P. pastoris* полученными плазмидами были отобраны штаммы с многокopiesной их интеграцией: Y-4484 и Y-4638 соответственно.

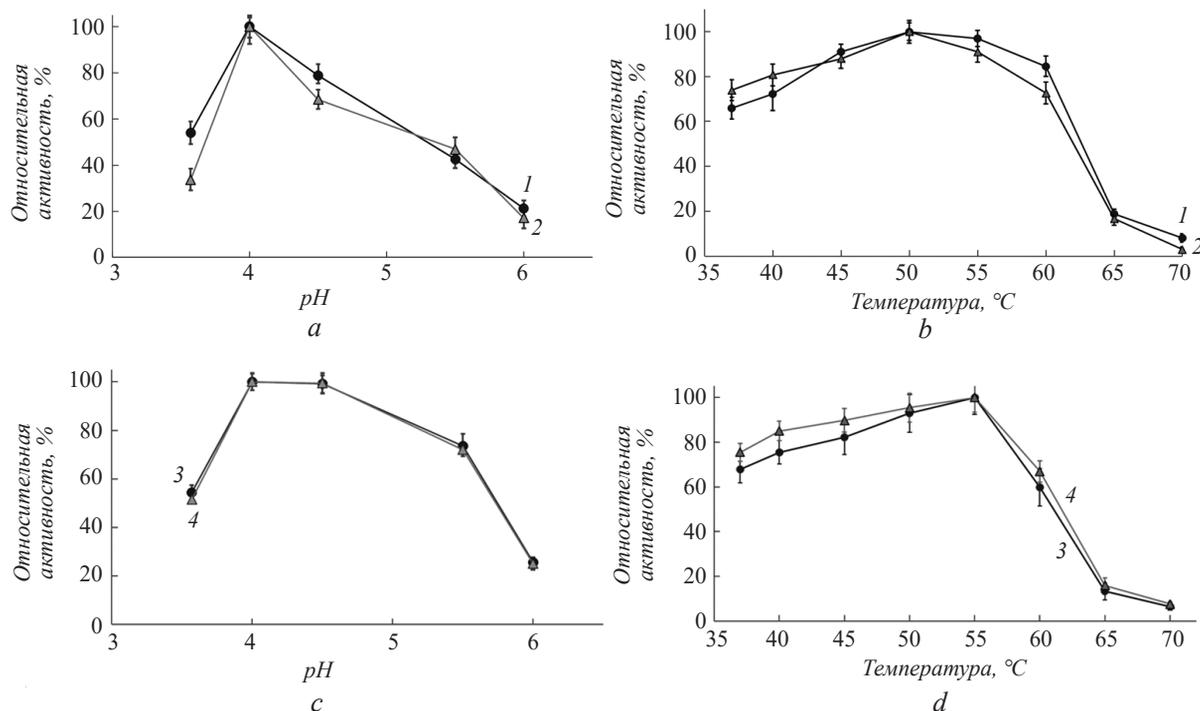
Штаммы-продуценты *O. polymorpha* ВКПМ Y-4641, Y-4644 культивировали в пробирках при 37 °C, а штаммы *P. pastoris* ВКПМ Y-4484 и Y-4638 – при 30 °C согласно протоколу.

Фитазы PhyCf и PhyS1 из КЖ штаммов-продуцентов были охарактеризованы. Основными критериями оценки ферментов были их свойства, важные для использования в качестве кормовых ферментов: активность в диапазоне pH 3,5–5,0; стабильность при температуре 37–42 °C; высокая удельная активность.

Была изучена зависимость активности фитаз PhyCf и PhyS1 от pH и температуры (рис. 2).

Фитазы PhyCf и PhyS1, секретируемые в дрожжах *O. polymorpha* или *P. pastoris*, имеют сходные профили активности в диапазоне pH 3,5–6,0 и температур от 37 до 70 °C. Фитазы PhyCf и PhyS1 проявляют наибольшую активность в диапазоне температур 37–60 °C (сохраняется более 60% активности) с оптимумом при температуре 50 °C для фитазы PhyCf и 55 °C для фитазы PhyS1, в диапазоне pH 3,5–5,0 (сохраняют более 50% активности) с оптимумом pH 4,0 для фитазы PhyCf и pH 4,0–4,5 для фитазы PhyS1.

Для определения удельной активности штаммы-продуценты растили в минеральной среде. Удельная активность фитаз PhyCf, экспрессированных в клетках дрожжей *O. polymorpha* и *P. pastoris*, составляет в среднем 1230 ед/мг и 1600 ед/мг соответственно. Более низкая удельная активность фитазы PhyCf из дрожжей *O. polymorpha* связана, возможно, с разной степенью гликозилирования этих белков в двух видах дрожжей (рис. 3a). Рекомбинантные фитазы PhyS1, продуцируемые дрожжами *O. polymorpha* и *P. pastoris*, имеют сходную удельную активность около – 3100 ед/мг. Удельная активность очищенных фитаз *C. freundii* и *Y. intermedia*, экспрессированных в дрожжах *P. pastoris*, составляет 2072 и 3960 ед/мг соответственно [1, 2]. Удельная активность очищенных белков всегда выше, чем белков в КЖ.



**Рис. 2.** Характеристика рекомбинантной фитазы PhyCf из *C. freundii* (a, b) и фитазы PhyS1 из *Y. intermedia* (c, d), продуцируемых в дрожжах *O. polymorpha* (1, 3) или *P. pastoris* (2, 4), при различных значениях pH (a, c) и температуры (b, d)

**Fig. 2.** Characterization of recombinant phytase PhyCf from *C. freundii* (a, b) and phytase PhyS1 from *Y. intermedia* (c, d) produced in *O. polymorpha* (1, 3) or *P. pastoris* (2, 4) yeast at various pH values (a, c) and temperatures (b, d)

Чтобы оценить стабильность рекомбинантных фитаз PhyCf и PhyS1, КЖ выдерживали при температуре 30, 37 и 42 °С в течение 24 ч, затем измеряли активность фермента по ГОСТ 31487-2012. Фитаза PhyCf теряла активность при температуре 37 и 42 °С: остаточная активность фермента, экспрессируемого как в клетках дрожжей *O. polymorpha*, так и *P. pastoris*, при температуре 30 °С составляла ~100% и после инкубации при температуре 37 и 42 °С снижалась до 60–70% и 25–35% соответственно.

Фитаза PhyS1, продуцируемая как в дрожжах *O. polymorpha*, так и в *P. pastoris*, была стабильна, сохраняя активность 100% при всех температурах в условиях эксперимента.

Белки из КЖ, полученной при культивировании штаммов при 30 и 37 °С, были проанализированы методом электрофореза в 12%-ном SDS-ПААГ (рис. 3). Штамм *O. polymorpha* ВКПМ Y-4641 продуцирует гликозилированную фитазу PhyCf с  $M_r$  80–120 кДа при 30 и 37 °С. В то же время рекомбинантная фитаза PhyCf, продуцируемая штаммом *P. pastoris* ВКПМ Y-4484 при 30 °С, представляет собой гликозилированный белок с  $M_r$  55–70 кДа, а при 37 °С – с  $M_r$  ~50–55 кДа. Рекомбинантная фитаза PhyS1, секретируемая штаммами *O. polymorpha* ВКПМ Y-4644 и *P. pastoris* ВКПМ Y-4638, имеет  $M_r$  ~45 кДа, независимо от температуры культивирования штаммов-продуцентов (рис. 3). Штаммы *O. polymorpha* и *P. pastoris* продуцируют рекомбинантную фитазу PhyCf с разной электрофоретической подвижностью, что может быть связано с разной степенью ее гликозилирования или с протеолизом. Известно, что температура влияет на синтез гликановых цепей, уча-

ствующих в формировании гликопротеинов [8], а некоторые свойства фермента могут зависеть от степени и природы гликозилирования [9].

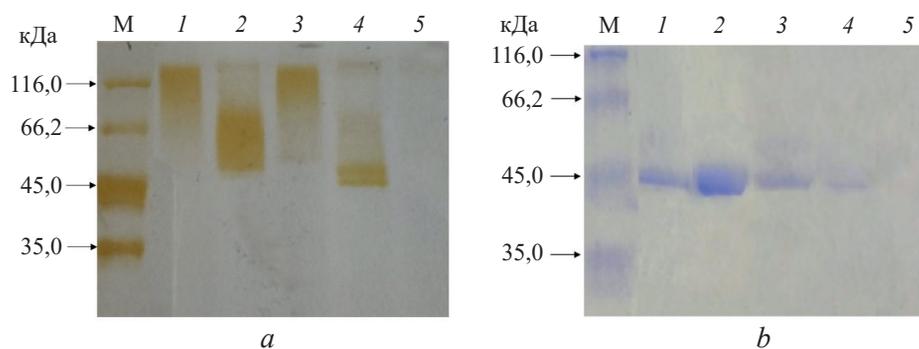
Благодаря способности фитаз PhyCf и PhyS1 активно гидролизовать фитат при кислых значениях pH и при температуре 37 и 42 °С их можно использовать для введения в растительные корма для моногастричных животных. При экспрессии в клетках дрожжей *O. polymorpha* их эффективность в рабочих диапазонах pH и температур сохраняется. В то же время при конструировании суперпродуцентов фитаз на основе термотолерантных дрожжей *O. polymorpha* выявлено преимущество фитазы PhyS1 по сравнению с фитазой PhyCf, что обусловлено более высокой удельной активностью и стабильностью во время длительной инкубации при температуре 37 и 42 °С.

Таким образом, дрожжи *O. polymorpha* можно рассматривать как перспективную систему для конструирования промышленных штаммов-продуцентов ферментов и проведения ферментации при температуре выше 37 °С.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI57917X0145) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

#### Дополнительный материал

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала <http://www.biotechnology-journal.ru>



**Рис. 3.** SDS-ПААГ анализ рекомбинантной фитазы PhyCf из *C. freundii* (a), продуцируемой штаммами *O. polymorpha* ВКПМ Y-4641 и *P. pastoris* ВКПМ Y-4484 и фитазы PhyS1 из *Y. intermedia*, продуцируемой штаммами *O. polymorpha* ВКПМ Y-4644 и *P. pastoris* ВКПМ Y-4638 (b). М – маркер молекулярной массы (Thermo Scientific, Литва), 1 и 3 – фитаза, продуцируемая дрожжами *O. polymorpha* при 30 °С и 37 °С, 2 и 4 – фитаза, продуцируемая дрожжами *P. pastoris* при 30 °С и 37 °С, 5 – КЖ из штамма *O. polymorpha* ВКПМ Y-2584 (родительский штамм) с вектором pMOX-Km-HARS

**Fig. 3.** SDS-PAGE analysis of recombinant phytase PhyCf from *C. freundii* (a), produced by the strains *O. polymorpha* VKPM Y-4641 and *P. pastoris* VKPM Y-4484 and phytase PhyS1 from *Y. intermedia*, produced by the strains *O. polymorpha* VKPM Y-4644, *P. pastoris* VKPM Y-4638 (b). М – protein molecular weight standard (Thermo Scientific, Литва), 1 and 3 – phytase produced by *O. polymorpha* yeast at 30 °С and 37 °С, 2 and 4 – phytase produced by *P. pastoris* at 30 °С and 37 °С, 5 – cultural supernatant from *O. polymorpha* VKPM Y-2584 (parental strain) harboring empty vector pMOX-Km-HARS

## ЛИТЕРАТУРА

1. Zhao W., Xiong A., Fu X., et al. High level expression of an acid-stable phytase from *Citrobacter freundii* in *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2010, 162, 2157–2165. doi: 10.1007/s12010-010-8990-4
2. Huang H., Luo H., Yang P., et al. A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 2006, 350, 884–889.
3. Abdel-Banat B.M.A., Hoshida H., Ano A., et al. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 85, 861–867. doi: 10.1007/s00253-009-2248-5
4. Mayer A.F., Hellmuth K., Schlieker H., et al. An expression system matures: a highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, 63(3), 373–381.
5. Hesampour A., Ranaei O., Malboob M.A., et al. Comparison of biochemical properties of recombinant phytase expression in the favorable methylotrophic platforms of *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*. *Prog. Biol. Sci.*, 2014, 4(1), 97–111.
6. Gordeeva T.L., Borschevskaya L.N. and Sineoky S.P. Improved PCR-based gene synthesis method and its application to the *Citrobacter freundii* phytase gene codon modification. *J. Microbiol. Methods*, 2010, 81(2), 147–152.
7. Saraya R., Gidijala L., Veenhuis M., van der Klei I.J. Tools for genetic engineering of the yeast *Hansenula polymorpha*. In: *Yeast Metabolic Engineering: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Ed. Mappelly V. Vol. 1152, Springer Science+Business Media, LLC, 2014, Part I, Chapter 3, 54–55. doi: 10.1007/978-1-4939-0563-8\_3
8. Tanapongpipat S., Promdonkoy P., Watanabe T., et al. Heterologous protein expression in *Pichia thermomethanolica* BCC16875, a thermotolerant methylotrophic yeast and characterization of N-linked glycosylation in secreted protein. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2012, 334, 127–134.
9. Guerrero-Olazarán M., Rodríguez-Blanco L., Carreón-Treviño J.G., et al. Expression of a *Bacillus* phytase C gene in *Pichia pastoris* and properties of the recombinant enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, 76(16), 5601–5608.

## Comparative Characteristics of Phytases from *Citrobacter freundii* and *Yersinia intermedia* Expressed in *Ogataea polymorpha* and *Pichia pastoris* Methylotrophic Yeasts

M. G. TARUTINA<sup>1,\*</sup>, M. D. KASHIRSKAYA<sup>2</sup>, M. N. LAZAREVA<sup>1</sup>, A. R. LAPTEVA<sup>1</sup>,  
V. Yu. DOBRYNIN<sup>2</sup>, T. L. GORDEEVA<sup>1</sup>, and S. P. SINEOKY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute»–GosNIIgenetika), Moscow, 117545 Russia

<sup>2</sup>Bioamide Closed Joint Stock Co., Saratov, 410033 Russia

\*e-mail: m\_tarutina@mail.ru

Received October 9, 2019

Revised November 5, 2019

Accepted November 11, 2019

**Abstract**—The genes for bacterial phytases from *Citrobacter freundii* and *Yersinia intermedia* were expressed for the first time in a thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha*. A comparative analysis of the properties of recombinant phytases produced by *Ogataea polymorpha* and *Pichia pastoris* yeasts was carried out. It was shown that the stability, pH and temperature profiles of the enzyme activities are the same regardless of the host strain. It was proved that *O. polymorpha* yeast can be used to create producers of feed enzymes and to develop a technology for their cultivation at temperatures above 37 °C. The prospects of using the *O. polymorpha* yeast for these purposes were evaluated.

**Key words:** *Ogataea (Hansenula) polymorpha*, *Pichia pastoris*, methylotrophic yeast, thermal tolerance, producer, recombinant phytase

**Acknowledgements**—The work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of RF (Project Unique Identifier RFMEFI57917X0145) using the Multipurpose Scientific Installation of All-Russian National Collection of Industrial Microorganisms National Bioresource Center, NRC «Kurchatov Institute»–GosNIIgenetika.

**Supplementary material**—The online version of this article contains supplementary material available free of charge at <http://www.biotechnology-journal.ru>

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-51-56