

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^{1,*}, М. Д. КАШИРСКАЯ², М. Н. ЛАЗАРЕВА¹, А. Р. ЛАПТЕВА¹, В. Ю. ДОБРЫНИН², Т. Л. ГОРДЕЕВА¹, С. П. СИНЕОКИЙ¹

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

²АО «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 гетерологичных 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; М₁ – 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 (GCGAATTCGAAGAACAATAATGGTATGAAG) 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

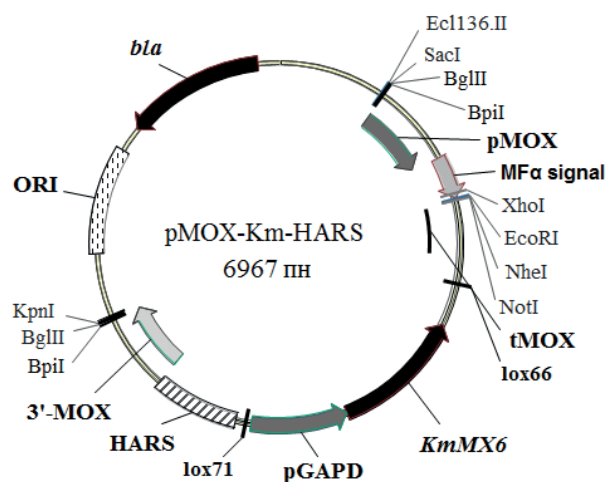


Рис. 1. Схема экспрессионного вектора pMOX-Km-HARS

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 $0,5-1 \times 10^4$ 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 α в рамку с сигнальным пептидом MF α . 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). Рекombинантные 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.

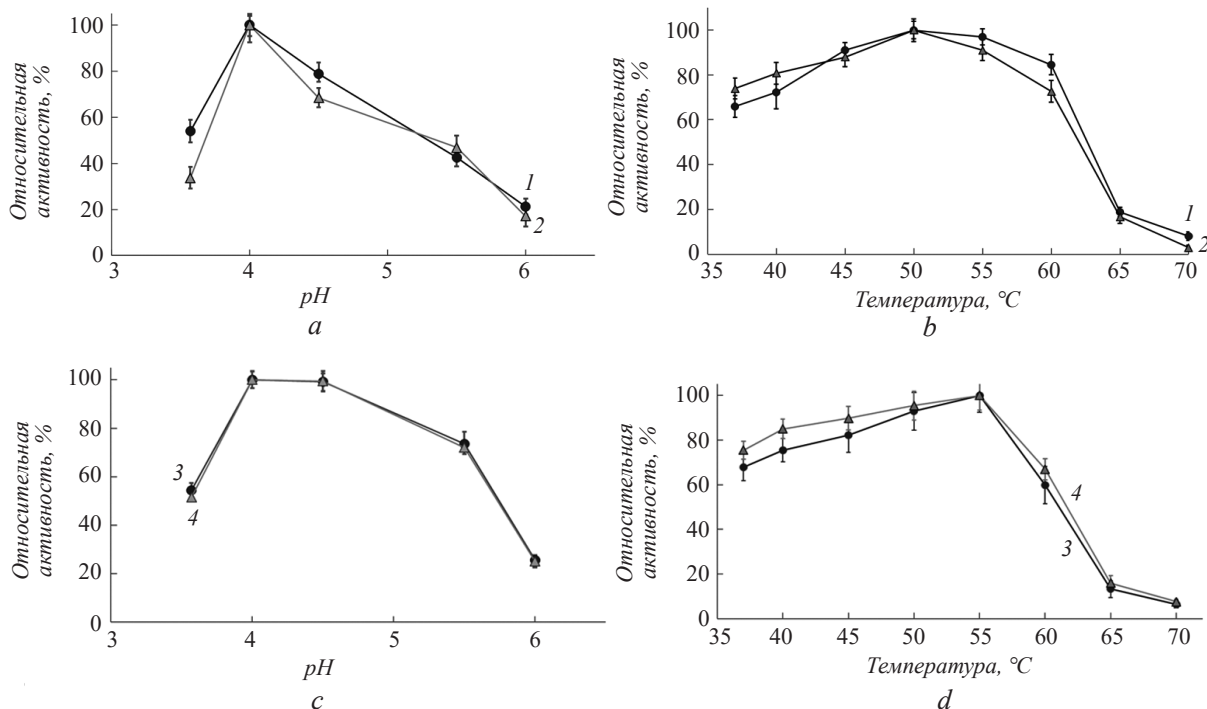


Рис. 2. Характеристика рекомбинантной фитазы PhyCf из *C. freundii* (a, b) и фитазы PhyS1 из *Y. intermedia* (c, d), продуцируемых в дрожжах *O. polymorpha* (1, 3) или *P. pastoris* (2, 4), при различных значениях pH (a, c) и температуры (b, d)

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>

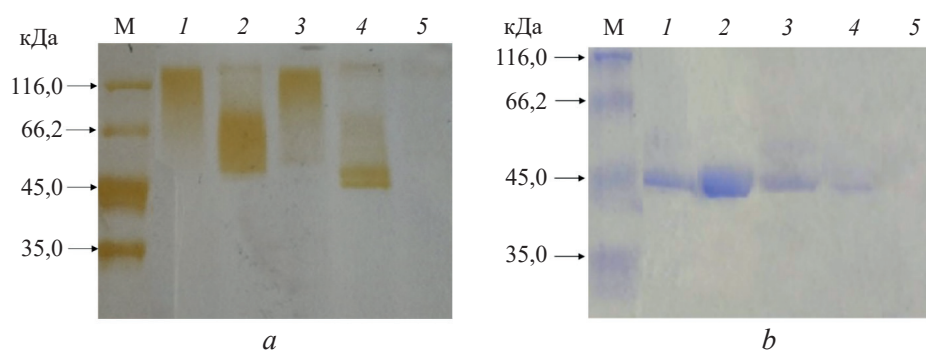


Рис. 3. SDS-ПААГ анализ рекомбинантной фитазы PhyCf из *C. freundii* (a), продуцируемой штаммами *O. polymorpha* ВКПМ Y-4641 и *P. pastoris* ВКПМ Y-4484 и фитазы PhyS1 из *Y. intermedia*, продуцируемой штаммами *O. polymorpha* ВКПМ Y-4644 и *P. pastoris* ВКПМ Y-4638 (b). М – маркер молекулярной массы (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). M – protein molecular weight standard (Thermo Scientific, Lithuania), 1 and 3 – phytase produced by *O. polymorpha* yeast at 30 °C and 37 °C, 2 and 4 – phytase produced by *P. pastoris* at 30 °C and 37 °C, 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^{1,*}, M. D. KASHIRSKAYA², M. N. LAZAREVA¹, A. R. LAPTEVA¹,
V. Yu. DOBRYNIN², T. L. GORDEEVA¹, and S. P. SINEOKY¹

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

²Bioamide 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