

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций

На правах рукописи

Соболева Елена Валентиновна

**Получение новых гидролаз, изучение их свойств и оптимизация
промышленно важных характеристик**

Направление подготовки 03.06.01 Физика и астрономия

Код и наименование

Направленность 03.06.01_12 Биофизика

Код и наименование

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах научно-квалификационной работы (диссертации)

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
Скворцов Алексей Николаевич

Санкт Петербург – 2020

[Введите текст]

Научно-квалификационная работа выполнена в Высшей инженерной-физической школе Института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», а также на базе лаборатории молекулярной и клеточной биофизики ПИЯФ НИЦ «Курчатовский институт».

Директор ВШ/Зав.каф. :

Журихина Валентина Владимировна,
доктор физико-математических наук,
профессор, Высшая инженерно-
физическая школа

Научный руководитель :

Скворцов Алексей Николаевич,
доктор биологических наук, профессор
ИФНиТ Высшая инженерно-
физическая школа

Рецензент:

Поварова Ольга Игоревна, к.б.н., с.н.с.
лаборатории Структурной динамики,
стабильности и фолдинга белков
Института цитологии РАН

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

Содержание

1	Обзор литературы.....	8
1.1	Взаимодействие фитатов с биологически значимыми молекулами.....	8
1.2	Фитаза	8
1.3	Источники фитазы.....	9
1.3.1	Растительные источники.....	9
1.3.2	Животные источники.....	10
1.3.3	Микроорганизмы, продуцирующие фитазу	10
1.4	Получение фитазы.....	12
1.4.1	Физические параметры.....	12
1.4.2	Источники углерода.....	12
1.4.3	Источники азота.....	13
1.5	Регуляция синтеза фитазы.....	13
1.5.1	Влияние фосфора.....	13
1.5.2	Влияние состава сред и размера посевного материала.....	14
1.6	Характеристика фитазы.....	14
1.6.1	Температура.....	14
1.6.2	pH.....	15
1.6.3	Влияние ионов металлов.....	16
1.6.4	Субстратная специфичность.....	16
1.6.5	Термостабильность ферментов.....	17
1.7	Подходы к увеличению термостабильности фитаз	18
1.8	Факторы, обеспечивающие термостабильность фитаз	19
2.	Материалы и методы.....	23
2.1	Обоснование выбранных подходов исследования	23
2.2	Процесс экспериментальных исследований.....	26
2.2.1	Сбор образцов почв.....	26
2.2.2	Получение изолятов микроорганизмов из образца почвы	29
2.2.3	Методики детекции ферментативной активности микроорганизмов на твёрдых селективных средах.....	30
2.2.4	Методика детекции секреторной и внутриклеточной фитазной ферментативной активности микроорганизмов.....	30
2.2.5	Выделение высокомолекулярной хромосомной ДНК для филогенетической 16S-идентификации и полногеномного секвенирования микробных природных изолятов.....	31
2.2.6	Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) фрагментов 16S рибосомной РНК для проведения филогенетической идентификации природных изолятов.....	32
3	Результаты.....	33
3.1	Результаты скрининга изолированных микроорганизмов	33
3.2	Проверка изолятов, на наличие секреторной и внутриклеточной фитазной активности.....	35
3.3	Выделение высокомолекулярной хромосомной ДНК.....	36
3.4	Идентификация родовой принадлежности отобранных микроорганизмов по последовательности 16S рРНК.....	37
3.5	Подготовка образцов хромосомной ДНК для полногеномного секвенирования (NGS).....	38

Общая характеристика работы

Актуальность работы

Восполнение исчерпаемых и невозобновляемых ресурсов неорганического фосфата – важная задача для сохранения баланса этого вещества в биосфере. В почве органическая форма фосфора представлена в основном в виде солей фитиновой кислоты. Они составляют до 50% от общего органического фосфора почв и являются хранилищами фосфора в семенах растений в процессе их созревания. Их гидролиз в природе осуществляется фитазами.

Фитазы (мио-инозитол гексафосфатфосфогидролазы) катализируют частичное или полное удаление ортофосфатов из фитатов (миоинозитол гексафосфатов). Фитат является основной формой накопления фосфора в злаках и бобовых, используемых в кормах для животных, и в семенах масличных культур. В фитатах содержится 60-90% общего фосфора, содержащегося в растениях. Животные с однокамерными желудками и домашняя птица не способны усваивать фитатный фосфор из-за отсутствия или низкого уровня фитазной активности. Кроме того, фитиновая кислота способна активно соединяться с катионами Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , а также с аминокислотами, белками и углеводами, уменьшая их доступность в кормах у моногастричных животных [1]. Неусвоенные фитаты выводятся с экскрементами из организма, попадают в почву и водоемы и загрязняют окружающую среду [2].

Таким образом, при производстве комбикормов важно вводить пищевые добавки, содержащие фитазы, с определёнными технологическими характеристиками. Препараты фитаз должны быть устойчивы к высушиванию и действию высоких температур в процессе приготовления комбикормов, а также приспособлены к действию в среде желудка животных (наличие активности при низких значениях рН и устойчивость к протеолитическим

[Введите текст]

ферментам). Кроме кормовой промышленности, фитаза нашла применение в биоэтанольной индустрии. Способность фитиновой кислоты в сырых зерновых субстратах образовывать комплексы с поливалентными металлами, крахмалом и белками замедляет процесс ферментативного расщепления, увеличивает количество отбросов и соответственно уменьшает выход конечного продукта. Гидролиз фитиновой кислоты мог бы решить эти проблемы.

Также фитат-гидролизующие ферменты могут использоваться для получения специфических изомеров мио-инозитол фосфатов – терапевтических соединений, химический синтез которых затруднён. Установлено, что мио-инозитол фосфаты являются важными компонентами сигнальных систем всех живых организмов и поэтому обладают фармакологическими свойствами [3-5]. Положение фосфатной группы в инозитольном кольце влияет на физиологические функции соединения. Фитазы гидролизуют мио-инозитол гексакисфосфаты последовательно и стереоспецифично, поэтому получение мио-инозитол фосфатов и свободного мио-инозитола с помощью фитаз является потенциальной альтернативой химическому синтезу.

Цели и задачи работы

Данная работа посвящена поиску и изучению новых фитаз, выделенных из природных изолятов, перспективных для применения в животноводстве и биоэтанольном производстве.

Для выполнения работы ставились следующие задачи:

1. Выделить и идентифицировать микроорганизмы-продуценты фитаз из почв различных регионов Российской Федерации.

2. Произвести оценку промышленно важных характеристик фитаз из отобранных микроорганизмов: ферментативной активности, рН оптимума активности.

[Введите текст]

3. Провести идентификацию родовой принадлежности отобранных микроорганизмов по последовательности 16S рРНК .

4. Подготовить образцы хромосомной ДНК отобранных изолятов для полногеномного секвенирования (NGS).

Научная новизна

В работе впервые исследовали и провели сравнение образцов почв различного происхождения, собранных из ряда регионов Российской Федерации, на наличие микроорганизмов-продуцентов фитаз. Из образцов почв выделили 117 новых уникальных природных изолятов, обладающих повышенной фитазной активностью, которые были законсервированы для дальнейшего изучения. 9 изолятов проверили на наличие внутриклеточной фитазной активности. У 4-х изолятов, показавших высокие значения внутриклеточной активности определили рН зависимость активности при семи различных значениях рН. Провели идентификацию родовой принадлежности отобранных микроорганизмов по последовательности 16S рРНК, и направили хромосомную ДНК этих микроорганизмов на полногеномное секвенирование.

Практическая значимость работы

В данной работе была создана уникальная коллекция микроорганизмов продуцентов промышленно важных ферментов - фитаз. Эти природные изоляты могут быть перспективными для получения новых фитаз, которые по своим биотехнологическим характеристикам не только не будут уступать уже известным фитазам, но и превосходить их. Также идентифицированные в результате скрининга микроорганизмы с фитазной активностью могут найти своё применение в качестве экологически чистого биоудобрения, увеличивающего доступность фосфора для питания растений.

1 Обзор литературы

1.1 Взаимодействие фитатов с биологически значимыми молекулами.

Фитиновая кислота (IP6) взаимодействует с другими пищевыми ингредиентами в качестве антипитательного фактора несколькими способами:

1) Молекулы IP6 имеют шесть реактивных групп, которые делают их сильным хелатирующим агентом, который связывает катионы Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} . В условиях pH желудка образуются нерастворимые фитатные комплексы металлов, таким образом, делая металл недоступным для всасывания в желудочно-кишечном тракте животных и людей [6]. В присутствии фитата и при добавлении ионов кальция, поглощение минералов происходит в результате образования нерастворимых комплексов [7]. Было показано снижение поглощения кальция и последующее индуцирование рахита при добавлении фитата в диеты для собак [8]. Ионы железа представляют собой другой важный питательный элемент, который способен связываться с фитатом. Ещё в 1975 году Davies и Nightingale показали, что фитат препятствует всасыванию ионов железа [9]. Также существует обратная связь между уровнем фитиновой кислоты в рационе и биодоступностью ионов цинка [10].

2) Фитаты снижают перевариваемость белков, крахмала и липидов. При связывании с фитатами белки становятся менее растворимыми, что снижает уровень их протеолиза [11]. Полифенолы и фитиновая кислота могут влиять на усваиваемость крахмала через взаимодействие с амилазами [12].

[Введите текст]

3) Было показано, что фитиновая кислота и инозитол-пентафосфат ингибируют действие определенных ферментов, таких как амилаза, трипсин, кислая фосфатаза [13].

1.2 Фитаза

Фитаза - это фермент, который гидролизует фитиновую кислоту до мио-инозитола и фосфорной кислоты с образованием миоинозитол-фосфатных интермедиатов.

Фитаза была впервые открыта Suzuki et al. В 1907 г. и, позже, в 1993-1994 гг. спустя 87 лет получила коммерческое распространение в Европе. Основными этапами изучения и коммерциализации фитазы были работы [14, 11]. На конец двадцатого века, ежегодные продажи фитазы в качестве кормовой добавки для животных оценивались в 500 миллионов долларов [15].

В зависимости от первого сайта инициации дефосфорилирования фитата все фитазы делят на три типа: 1) 3-фитазы (мио-инозитолгексакис- фосфат-3-фосфогидролазы, ЕС 3.1.3.8), 2) 6-фитазы (мио-инозитолгексакисфосфат-6-фосфогидролазы, ЕС 3.1.3.26) и 3) 5-фитазы (мио-инозитолгексакисфосфат-5-фосфогидролазы, ЕС 3.1.3.72). 3-Фитазы, обнаруженные у грибов и бактерий, инициируют дефосфорилирование фитата по третьему (d-3) или первому (d-1) углеродному атому кольца инозитола. 6-Фитазы, обнаруженные в семенах высших растений, и 5-фитазы, выделенные из люцерны, бобов, гороха и *Selenomonas ruminantium*, инициируют дефосфорилирование фитата по шестому и пятому углеродному атому (d-6 и d-5) соответственно [16].

На основании рН-оптимума ферменты, расщепляющие фитат, разделяют на два класса: кислые и щелочные. В группу кислых фитаз входят ферменты, относящиеся к гистидиновым кислым фитазам (HAP_s), а также цистеиновые фитазы (CP_s), пурпурнокислые фитазы (PAP_s) и недавно идентифицированные белковые тирозиновые фосфатазы (РТР-подобные инозитолполифосфатазы). Класс щелочных фитаз представляют

[Введите текст]

внеклеточные β -пропеллерные фитазы (BPP_S) грамположительных спорообразующих бактерий рода *Bacillus* [16].

Фитазы катализируют следующие реакции:

3-фитаза (ЕС 3.1.3.8) атакует фитат в 3-й позиции [17]:

Мио-инозитол гексакисфосфат + H₂O = D-миоинозитол 1,2,4,5,6-пентакисфосфат + ортофосфат.

6-фитаза (ЕС 3.1.3.26) атакует фитат в положении 6 [18,19]:

Мио-инозитол гексакисфосфат + H₂O = D-мио-инозитол 1,2,3,4,5-пентакисфосфат + ортофосфат.

1.3 Источники фитазы

1.3.1 Растительные источники

Фитазы были обнаружены в рисе, пшенице, кукурузе, сое, карликовых бобах и других бобовых, а также в семенах масличных культур [20,21,22]. В прорастающих семенах или пыльце фитаза отвечает за деградацию фитина [23].

Suzuki et al. (1907) были первыми исследователями, которые сделали препарат из фитазы. Они обнаружили фитазную активность в рисе и пшеничных отрубях и смогли выделить инозитол в качестве продукта реакции. Позже была описана фитаза, выделенная из листьев лука, которая имеет максимальную активность при pH 5,5 и 51°C [24]. Также была очищена и охарактеризована фитаза из прорастающих семян кукурузы и, кДНК этой фитазы была клонирована [25,26]. Это позволило выделить соответствующие гены и изучить их регуляцию. Для получения фитазы из семян сои, в 1990 г. был предложен способ осаждения сульфатом аммония [22]. Фитаза из пшеничных отрубей была разделена с помощью DEAE-целлюлозы на две фракции, к которым применяли разные схемы деградации субстрата [27].

1.3.2 Животные источники

Первые упоминания о фитазе в печени и крови телят были сделаны в 1908 г. Однако дальнейший поиск фитазы в крови млекопитающих оказался безуспешным; фитаза была обнаружена в крови других групп позвоночных, таких как, птицы, рептилии, рыбы, морские черепахи [28]. Поскольку фитат действует как антипитательный фактор, необходимо было исследовать наличие фитазы в желудочно-кишечном тракте различных животных. Впервые гидролиз фитата был обнаружен в кишечнике крыс [29]. Фитазная активность также наблюдалась в кишечнике свиньи, овцы и коровы [30]. В 1972 г была очищена фитаза, выделенная из крысы, курицы, теленка и из кишечника человека [31]. В сравнении с крысой, фитазная активность, обнаруженная в кишечнике человека, оказалась примерно в 30 раз ниже. В норме тонкая кишка человека имеет ограниченную способность переваривать недеградированные фитаты [32]. Жвачные животные, вероятно, переваривают фитат благодаря действию фитазы, продуцируемой микробной флорой в рубце желудка. Неорганические фосфаты, полученные при расщеплении фитата используются как микробной флорой, так и самим жвачным животным.

1.3.3 Микроорганизмы, продуцирующие фитазу

Фитазы были обнаружены в ряде бактерий. Бактериальные фитазы в основном имеют внутриклеточную активность, за исключением *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus amylovorus* и *Enterobacter sp. 4*. На способность продуцировать фитазу было проверено более 200 грибковых изолятов, принадлежащих к *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* и *Rhizopus* [27]. Все изоляты обладали внеклеточной фитазной активностью. Было обнаружено, что *Aspergillus niger* является наиболее активным производителем фитазы.

[Введите текст]

Aspergillus niger NRRL 3135 продуцирует две разные фитазы, одна с рН оптимумом на 5,5 и 2,5, а другая с рН оптимумом 2,0 при температуре 55 °С. Позже эти ферменты были обозначены рНуА и рНуВ соответственно.

Термофильный гриб *Thermomyces lanuginosus* имеет оптимальную активность при 65 °С и рН 6,0 [33]. Другой термофильный гриб *Sporotrichum* продуцирует фитазу при 45 °С и при рН 6,0 [34]. Фитаза, выделенная из *Aspergillus fumigatus* активна при рН 6,0-6,5 и 37 °С [35].

Также фитазная активность была обнаружена в клетках грибов, таких как *A. clavatus* J239, *A. flavipes* Fla. A-14, *A. flavus*, *A. nidulans* QM-329, *A. niger* NRRL 67, *A. niger* P330, *A. oryzae* QM228, *A. phoenicus* QM 329, *A. repens* QM-44С, *A. terreus* Fla.C- 93, *A. tamaris* J1008, *Mucor spp.*, *Penicillium SPP.* P-320 и *Rhizopus spp.* [36].

Среди дрожжей внеклеточная фитаза была выявлена у *Schwanniomyces castellii* [37] и *Arxula adenivorans* [38]. Молекулярная масса нативной фитазы *S. castellii* составляет 490,0. Оптимальная температура для активности фитазы *S. castellii* составляет 77 °С, и фермент стабилен в течение 1 ч при 74 °С.

Также сообщается, что дрожжи *Arxula adenivorans* являются одними из немногих, способных усваивать фитат в качестве единственного источника углерода и фосфатов. При проведении скрининга нескольких видов дрожжей для выявления внеклеточной фитазной активности, *Pichia spartinae* и *P. rhodanensis* показали самые высокие уровни [39]. Фермент *P. Spartinae* показал наиболее высокую оптимальную температуру реакции при 75-80 °С, тогда как для *P. rhodanensis*, температура составляет от 70 до 75 °С, при оптимальном значении рН от 3,6 до 5,5 и 4,5 до 5 соответственно.

Фитаза из *P. anomala* была обнаружена в клеточной фракции. Оптимум температуры и рН составляет 60 °С и 4.0 соответственно. Фермент демонстрирует широкую субстратную специфичность и термостабильность [40].

1.4 Получение фитазы

1.4.1 Физические параметры

Важными физическими параметрами, оказывающими сильное влияние на рост организмов и выработку метаболитов, являются pH, температура, концентрация кислорода и давление. Все микроорганизмы, продуцирующие фитазы, представляют собой мезофилы, за исключением термофильных грибов *Thermomyces lanuginosus* [33], *Talaromyces thermophilus* [35] и *Sporotrichum thermophile* [34]. Оптимальная температура для производства фитазы для большинства микроорганизмов находится в диапазоне от 25 до 37 °С. Оптимальный pH для большинства бактерий и грибов находится в диапазоне от 5,0 до 7,0.

В *Schwanniomyces castellii*, продуцирование фитазы осуществлялось непрерывно в ферментере, аэрированном при 1 об. / мин, и перемешивании при 600 об. / мин [37]. Производство фитазы грибами *A. niger*, *A. ficuum* NRRL 3135, и *A. terreus* осуществлялось при 270 об. / мин [41]. Фитазу из *Bacillus sp.* DS11 получали на 230 об / мин [42].

1.4.2 Источники углерода

Оптимальная концентрация углерода также относится к важным факторам для производства фитазы. Наиболее предпочтительным субстратом для производства фитазы является глюкоза. Показано, что 1% глюкоза оптимальна для производства фитазы *Lactobacillus amylovorus* и *Enterobacter sp.* 4 [43, 44]. Глюкоза в концентрации 2% используется для *Bacillus subtilis* [45].

[Введите текст]

Было показано, что, если заменить глюкозу (2%) на галактозу в дрожжевой пептон-глюкозной среде, производство фитазы *Arxula adenivorans* увеличивается в несколько раз [38]. Галактоза (1%) является предпочтительным источником углерода для производства фитазы культурой *Schwanniomyces castellii* [37]. Для грибов используют отвар солодовых дрожжевых экстрактов [41].

1.4.3 Источники азота

Источник азота в культуральной среде это еще один важный параметр, который влияет на рост и выработку ферментов. Органическая форма азота, такая как пептон широко используется для производства фитаз. Пептон (1%) используется *Aerobacter aerogenes* [46]. Неорганический источник азота, такой как сульфат аммония (0,1%) используется для производства фитазы *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.* 4, *S. castellii* [47, 44, 48]. Гидролизат казеина (1%) и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1%) используется в качестве источника азота для производства фитазы *B. subtilis* [49]. Для *A. Adeninivorans* хорошими источниками азота являются дрожжевой экстракт (1%) и пептон (1%) [38].

1.5 Регуляция синтеза фитазы

1.5.1 Влияние фосфора

Содержание доступного неорганического фосфора в среде регулирует синтез фитаз [41]. Чаще всего в качестве источников фосфора для фитазы используются - KH_2PO_4 и K_2HPO_4 . Для *Bacillus sp.* DS11, среда содержала KH_2PO_4 (0,05%) и K_2HPO_4 (0,04%) [42]. Для *B. subtilis* фитат натрия (0,06%) использовался вместе с KH_2PO_4 (0,1%). Для анализа на чашке в качестве нерастворимого субстрата использовали фитат кальция (0,5%). У *S. castellii*, в качестве источника фосфора использовали только фитат натрия (0,06%) [37].

[Введите текст]

Фосфат, присутствующий в различных ингредиентах, ингибировал синтез фитазы у нескольких видов дрожжей [41; 50]. Выработка фитазы грибами в среде, содержащей кукурузную муку, зависит от содержания в ней фосфора. После удаления фосфата из среды, содержащей мелассу, удельная активность фитазы *A. niger* AbZ4 увеличивается в 7,3 раза [51]. Регулирующий эффект высокого содержания фосфора на синтез фитазы подтвержден в работах [52, 53, 54]. В случае *Lactobacillus amylovorus* оптимальный уровень фосфата составляет 240 мг/л и поддерживает максимальную выработку фитазы [43]. На выработку фитазы *A. ficuum* влияет концентрация фосфатов в жмыхе канолы [55]. У *Candida krusei* выработка фитазы контролируется концентрацией фосфата в среде [56]. Максимальную выработку наблюдали в среде, содержащей 0,5 мг фосфора на 100 мл. Увеличение концентрации до 5 мг на 100 мл вызывает угнетение синтеза фитазы.

1.5.2 Влияние состава сред и размера посевного материала

В глюкозе или фруктозе, используемой в качестве единственного источника углерода, образовывались мицелиальные гранулы и наблюдался низкий выход фермента *A. niger* NRRL 3135 [41]. Концентрация глюкозы (до 5,2%) увеличивала секрецию фитазы *A. ficuum* [55]. Высокая концентрация глюкозы (9,8% и 17,8%) оказывала отрицательное влияние.

Если размер посевного материала слишком мал, и используется среда с относительно низкой вязкостью, организмы имеют тенденцию образовывать гранулы [57].

1.6 Характеристика фитазы

1.6.1 Температура

[Введите текст]

Фитазы с высокотемпературным оптимумом необходимы для производства кормов для животных, так как гранулирование корма происходит при нагревании до 80 - 85 °С. Фитазы из *B. subtilis* [58], *E. coli* [59], *Klebsiella aerogenes* [60], *Enterobacter sp.* [44] и *Selenomonas ruminantium* [61] имеют оптимальную активность в диапазоне температур от 50 до 60°C, в то время как фитаза *Aerobacter aerogenes* имеет оптимум при 25°C [46]. Фитаза *S. castellii* оптимально активна при 77 °С [37] и *A. adenivorans* показывает максимальную фитазную активность при 75 °С [38]. Фитазы из *Pichia rhodanensis* и *P. Spartinae* имеют оптимальную активность в интервале температур от 70 до 75 °С и от 75 до 80 °С соответственно [39].

Среди теплолюбивых грибов, *Thermomyces lanuginosus* показал оптимальную активность при 65 °С. [33] и *Sporotrichum thermophile* при 45 °С [34]. Фитаза *A. fumigatus* и *A. niger* NRRL 3135 демонстрируют оптимальную активность при 37 °С [35] и при 55 °С [52] соответственно.

1.6.2 pH

Большинство фитаз, особенно грибного происхождения, имеют оптимум активности в основном при pH от 4,5 до 5,5. У некоторых фитаз бактериального происхождения наблюдается оптимум pH от 6,5 до 7,5. Для фитазы *A. aerogenes* [46], *Pseudomonas sp.* [47], *E. Coli* [59], *S. ruminantium* [61], *L. amylovorus* [43], оптимальный pH находится в диапазоне между 4 и 5,5. Оптимум pH *Enterobacter sp.* [44] и *Bacillus sp.* DS11 [42] находится в нейтральном диапазоне (от 7 до 7,5). *A. niger* NRRL 3135 продуцирует два разных вида фитазы, один с оптимумом pH 5,5 и 2,5, и другой с оптимумом 2.0. Фитазы *T. lanuginosus* [33] и *A. fumigatus* [35] оказались оптимально активными при pH от 6.0 до 6.5. Оптимальный pH для фитазы *S. castellii* 4,4 [37], для *A. adenivorans* - 4,5 [38].

[Введите текст]

Также было установлено, что все дрожжевые фитазы обладают оптимумом рН от 4 до 5 при температуре от 50 до 60 °С. При 37 °С многие штаммы продуцировали другую фитазу с оптимумом рН от 3 до 4.

1.6.3 Влияние ионов металлов

Фитазы различаются по их потребности в ионах металлов. Фитаза *S. castellii* незначительно ингибируется в присутствии 5 мМ Ca^{2+} и Mg^{2+} , Mn^{2+} и Fe^{2+} . Катионы Zn^{2+} и Cu^{2+} (0,5 мМ) вызывают ингибирование фермента примерно на 50%; 5 мМ Zn^{2+} и Cu^{2+} вызывают сильное ингибирование реакции [37]. Фитаза *Bacillus sp.* DS11 сильно ингибируется ЭДТА, Cd^{2+} и Mn^{2+} и умеренно ингибируется Hg^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} и Cu^{2+} (5 мМ) [42]. В реакционной смеси, содержащей 5 мМ Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} и Hg^{2+} , фитазная активность *Selenomonas ruminantium* ингибируется сильно [61]. Частично очищенный фермент из *Klebsiella oxytoca* МО-3. сильно ингибируется NaF , Zn^{2+} , Fe^{2+} и Cu^{2+} , но не ингибируется ЭДТА или N-этилмалеимидом [62].

Для фитазы *B. subtilis* удаление ионов металлов из фермента с помощью ЭДТА приводит к полной инактивации. Потеря ферментативной активности, скорее всего, связана с конформационными изменениями, так как спектры кругового дихроизма холофермента и фермента, обедненного ионами металлов, различаются. Фермент, обедненный ионами металлов, был частично способен восстанавливать активную конформацию при инкубировании в присутствии Ca^{2+} [63].

1.6.4 Субстратная специфичность

[Введите текст]

Фитазы обычно обладают широкой субстратной специфичностью, с самым высоким сродством к фитату. Описаны лишь несколько фитаз, высокоспецифичных для фитиновой кислоты. Фитаза из *Bacillus sp.* DS11 имеет высокую специфичность к фитату и обладает небольшой или нулевой активностью в отношении эфиров фосфорной кислоты, таких как п-нитрофенилфосфат, АТФ, АДФ, АМФ, β-глицерофосфат, пирофосфат натрия и α-нафтилфосфат [42]. Аналогично фитаза из *Pseudomonas sp.* не проявляет активности в отношении неорганического пирофосфата, β-глицерофосфата, АДФ или АМР, а активность против п-нитрофенилфосфата составляет 14% от активности фитата [47].

Фитазы *A. fumigatus*, *E. nidulans*, и *M. thermophila* демонстрируют широкую субстратную специфичность, в то время как фитазы *A. niger*, *A. Terreus* CBS и *E. coli* достаточно специфичны к фитиновой кислоте [64]. Также была показана широкая субстратная специфичность для фитаз *S. castellii*. Значение K_m для фитата было самым низким, в то время как глюкозо-1-фосфат, глюкозо-6-фосфат, п-нитрофенилфосфат и АТФ показали более высокие значения [37].

Избыток субстрата ингибирует фермент. Было обнаружено, что концентрация мио-инозитола-Р6, превышающая 2 ммоль/л, является ингибирующей [65].

1.6.5. Термостабильность ферментов

Стабильность фитазы имеет важное значение при высокотемпературном производстве кормов и для применения этого фермента при производстве этанола из сырья на основе крахмала. Способность фитиновой кислоты в сырых зерновых субстратах образовывать комплексы с поливалентными металлами, крахмалом и белками замедляет ферментативные реакции, увеличивает количество отходов и, соответственно, уменьшает выход конечного продукта. Гидролиз фитиновой кислоты мог бы решить эти

[Введите текст]

проблемы. Фитаза может быть добавлена либо на стадии разжижения сырья для повышения эффективности термостабильной альфа-амилазы, либо в процессе ферментации дрожжей. Диапазон температур в процессе сжижения, занимающего 90-140 минут, составляет 76-87 °С, поэтому, на данном этапе, предпочтительным является применение термостабильных фитаз [66].

Корма для животных могут быть загрязнены патогенными бактериями. В кормах *Salmonella spp.* является основной микробиологической опасностью, которая может привести к заражению животных [67]. По этой причине для дезинфекции в большинстве стран проводят термическую обработку кормов [68]. Корма часто гранулируют для улучшения усвояемости, совмещая этот процесс с термической обработкой [69; 70]. При гранулировании к корму подводится пар, температура которого часто может достигать 90 °С. Большинство микробных фитаз термостабильны примерно до 70 °С, поэтому тепловые процессы производства корма, проходящие при более высоких температурах, резко снижают активность фитазы [71]. Новые термостабильные фитазы получают как скринингом термофильных или мезофильных микроорганизмов, так и с применением передовых методов молекулярной биологии и биофизики, позволяющих повышать термостабильность известных ферментов [72].

1.7 Подходы к увеличению термостабильности фитаз

В настоящее время для защиты фитаз от термоинактивации используют иммобилизацию фермента на носителе, инкапсуляцию, а также модификацию фермента с применением методов направленной эволюции или молекулярного моделирования. Иммобилизация фитазы защищает фермент в процессе гранулирования. Однако во многих случаях было замечено, что она уменьшает высвобождение ферментов в желудочно-кишечном тракте животного. [73]. Резкий рост числа патентов, выданных за последние 10 лет, также свидетельствует о том, что иммобилизация ферментов, используемых в

[Введите текст]

кормах для животных, обеспечивает большую устойчивость к нагреву и другим физико-химическим условиям при переработке и хранении кормов. С помощью технологии электроспиннинга рисовые отруби использовались для синтеза пищевых волокон наноразмерного масштаба. Фитаза, включенная в эти нановолокна продемонстрировала кардинальное увеличение устойчивости к термоинактивации, при которых температура денатурации фермента увеличилась с 80 до 170 °С. Эти результаты выявили новые возможности стабилизации биомолекул иммобилизацией в нановолокнах на основе отходов сельского хозяйства [74]. Помимо этого, была описана ковалентная иммобилизация фитазы на многостенных углеродных нанотрубках (FMWNTS), в которых иммобилизованная фитаза проявляла улучшенную стабильность к температуре по сравнению со свободной фитазой. Свободная фитаза сохраняет 27% и 3% относительной активности при 80 и 90 °С, соответственно, после 2 мин инкубации. В то время как иммобилизованная фитаза сохраняет примерно 33% и 51% активности при тех же условиях [76]. С другой стороны, исследователи из Университета Лавала в Квебеке изучили инкапсуляцию микробной фитазы и ее влияние на биодоступность фосфора у радужной форели *Oncorhynchus mykiss*, и пришли к выводу, что инкапсуляция снижает способность фермента высвобождать фосфор [75].

Фитазы, выделенные из мезофилов, более широко изучены, поскольку фитазы, продуцируемые термофилами, проявляют низкую активность при физиологической температуре животных [77]. Мезофилы адаптируют свои белки для оптимального функционирования в нормальных условиях окружающей среды и поддерживают их структурную целостность только в ограниченном диапазоне температур. С целью выявления структурных особенностей фитаз, обеспечивающих их устойчивость к повышенной температуре в течение последних двух десятилетий проводились научные исследования, включающие кристаллизацию фитаз из различных микробных источников, сравнение вариантов мезофильных и термофильных ферментов и случайные или рациональные изменения аминокислот [78; 79]

1.8 Факторы, обеспечивающие термостабильность фитаз

Значительный объем литературы свидетельствует о том, что введение дисульфидных связей в фитазы эффективно улучшает характеристики термостабильности. В ранних экспериментах в ходе развернутых исследований с использованием гидрохлорида гуанидина (GuHCl) в качестве денатуранта предсказали наличие пяти дисульфидных связей в фитазе *Aspergillus ficuum*. Позже была исследована роль этих связей в конформационной стабильности и каталитической активности [80; 81; 82]. В другом исследовании провели молекулярное моделирование двух вариантов фитазы В из *Aspergillus niger*: с полностью насыщенными дисульфидными связями и без дисульфидных связей. Это исследование показало, что дисульфидные связи стабилизируют β -лист, содержащий остаток Arg66, входящий в состав активного центра, и дестабилизируют α -спираль, содержащую каталитический остаток Asp319 [83]. В то же время, фитазы грамположительных бактерий с укладкой типа бета-пропеллер (BPPs) не имеют дисульфидных связей, а введение новых дисульфидных связей не изменяет их каталитических свойств [84].

Термостабильность кислотоустойчивой фитазы из ацидобактерий была улучшена путем введения четырех дополнительных дисульфидных связей с помощью подходов рационального дизайна [85].

Также была продемонстрирована функциональная важность водородных связей и ионных взаимодействий в поддержании термостабильности фитаз. По сравнению с коммерческой фитазой *phyA*, полученной из *Aspergillus niger*, фитаза *Aspergillus fumigatus* обладает повышенной термоустойчивостью, поскольку она сохраняет 90% своей первоначальной активности при температуре 100 °C в течение 20 минут. При гомологии аминокислотных последовательностей в 66% эти два фермента обладают очень похожими кристаллическими структурами.

[Введите текст]

Термостабильность фитазы *A. fumigatus* обусловлена образованием водородных связей между аминокислотными остатками E35 и S42 и ионными взаимодействиями между R168 и D161 и между R248 и D244, что было доказано одиночными или комбинированными аминокислотными заменами, приводившими к потере термостабильности (E35A, R168A и R248A). Когда соответствующие замены были введены в фитазу *A. niger*, комбинированный мутант (A58E P65S Q191R T271R) продемонстрировал активность на 20% выше, чем у белка дикого типа при температуре 80 °C в течение 10 минут [86]. Введение водородной связи образуемой боковой цепью остатка в положении 144, за счёт введения аминокислотной замены D144N, стабилизировало структуру петли Gln137-Asn144 фитазы *appA E. coli* (кислая фосфатаза pH 2,5), обеспечило повышение термостабильности на 15% и повышение температуры плавления на 4-5 °C [87]. Два варианта фитазы *appA* K46E и K65E/K97M/S209G, полученные методом направленной эволюции, также характеризовались образованием новых внутримолекулярных водородных связей и продемонстрировали более чем 20%-ное улучшение термоустойчивости (80 °C в течение 10 мин) и повышение температуры плавления на 6-7 °C [88]. В другом исследовании методом случайного мутагенеза гена фитазы *Penicillium sp.*, получили две мутантных формы белка (T11A/G56E/L65F/Q144H/L151S и T11A/H37Y/G56E/L65F/Q144H/L151S/N354D) с улучшенной термостабильностью. Обе мутантных формы сохраняли около 72% и 92% начальной активности, соответственно, после термической обработки при 100 °C в течение 5 мин, и эта стабильность была обусловлена образованием новых водородных связей между смежными вторичными структурами [89]. Методами молекулярной динамики исследовали фитазы *Aspergillus niger* PhyA и его мутантную форму, обладающую на 20% большей термостабильностью, и сравнивали параметры подвижности атомов ферментов, радиусы гирации и количество внутримолекулярных водородных связей. В результате был сделан вывод о том, что важные термостабилизирующие аминокислотные замены могут

[Введите текст]

располагаться в петлях, и, кроме того, расположение водородных связей, а не их количество, играет решающую роль в термостабильности [90].

В частности, оптимизация сети водородных связей в фитазе *Yersinia mollaretii* за счет введения ключевых аминокислотных замен, возникших в результате проведения направленной эволюции, привела к снижению подвижности петель и повышению термостабильности (температура плавления увеличилась на 3 °С по сравнению с диким типом, а остаточная активность увеличилась с 35% до 89% при 58 °С и 20-минутной инкубации) [91].

В фитазе *E. coli* для образования новых водородных связей на основе рационального дизайна ввели шесть замен аминокислотных остатков, расположенных на поверхности фермента (K74D/K75Q/K180N/R181N/-K183S/K363N). По мере постепенного повышения температуры с 25 до 85 °С, спектр кругового дихроизма исследуемых фитаз показал снижение содержания в структуре α -спиральных участков. Величина температуры плавления фитазы дикого типа составила 60,3 °С, в то время как мутантные формы демонстрировали увеличение температуры плавления на 1,2–3,8 °С, что свидетельствует о стабилизирующей роли замен при термической денатурации [92].

Гликозилирование белка является одной из наиболее распространенных структурных модификаций, используемых биологическими системами для расширения разнообразия протеомов. Белок гликозилируется различными гликанами по остаткам аспарагина (N- гликозилирование через последовательность распознавания Asn-X-Thr/Ser) и по остаткам серина или треонина (О-гликозилирование). Хорошо известно, что гликаны играют важную роль в повышении общей стабильности гликопротеинов, а рациональное управление параметрами гликозилирования путем введения новых участков гликозилирования в белки предоставляет широкие возможности для оптимизации операционной стабильности как промышленных, так и фармацевтических белков. После добавления сайтов N-

[Введите текст]

гликозилирования в фитазу *E. coli* *arrA* уровень гликозилирования мутантных форм A131N/V134N/D207N/S211N, C200N/D207N/S211N и A131N/V134N/C200N/D207N/S211N составил 48, 89 и 145% для соответственно [93].

В другом исследовании мутантная форма *arrA E. coli* (Q258N/Q349N) продемонстрировала повышение термостабильности на 40% (85 °С в течение 10 мин) и повышение температуры плавления на 4-5 °С по сравнению с ферментом дикого типа [94].

2. Материалы и методы

2.1 Обоснование выбранных подходов исследования

Выбор в данной работе почвы в качестве источника микроорганизмов-продуцентов фитаз основывался на том, что почва – это сложная и структурированная экосистема, характеризующаяся очень высоким биоразнообразием. Почва является многокомпонентной средой обитания микроорганизмов, состоящей из твёрдых частиц. В отличие от водных систем, почва практически не перемешивается, однако растворимые компоненты почвы могут переноситься грунтовыми водами и пересаживаться на других участках. Микроорганизмы локализуются на частицах почвы, таких как, например, гумусно-глиняные смеси [95] и обнаруживаются в виде отдельных клеток или микроколоний, которые часто встраиваются в каркас из полисахаридов. Их метаболизм и взаимодействие с другими организмами и с частицами почвы зависит от условий, создаваемых микросредой обитания, часто различающейся даже на очень малых расстояниях. Микросреда обитания для почвенных микроорганизмов представляет собой микропоры и поверхности агрегатов частиц почвы различного состава и размеров [96]. Таким образом, почву можно рассматривать как очень неоднородную среду, создающую многообразие условий для роста и пространственного

[Введите текст]

распределения микроорганизмов. Эта гетерогенность формирует широкое разнообразие микробных ниш, что, в свою очередь, порождает безграничное многообразие почвенных микроорганизмов. По сравнению с другими средами обитания микробное разнообразие почв многократно выше: один грамм почвы может содержать до 10 миллиардов микроорганизмов, относящихся, возможно, к тысячам различных видов [97]. Генетическое многообразие микробных почвенных сообществ оценили реассоциацией их ДНК. Такие анализы показали, что, не принимая во внимание геномы редких и неидентифицированных микроорганизмов почвы, общий объём уникальных последовательностей ДНК эквивалентен 6000–10000 геномов *Escherichia coli* [98,99]. Таким образом, генетическое разнообразие совокупности геномов микроорганизмов почвы, называемого метагеномом, является богатым и, в то же время, крайне неисследованным ресурсом для поиска новых промышленных ферментов и биологически активных соединений.

Бактерии и грибы являются наиболее распространенными и экологически важными фитосимбионтами. Значительное влияние на распространение в почве тех или иных групп микроорганизмов вызывает корневые выделения растений. Они обеспечивают питательными веществами почвенные микроорганизмы. Масса корневых выделений может составлять 30-50% от общего фотосинтеза. Корневые выделения, или корневые экссудаты представляют собой низкомолекулярные органические вещества, являющиеся продуктами фотосинтеза и метаболизма растений: сахара, органические кислоты, аминокислоты, спирты, а также физиологически активные вещества – витамины, ферменты, гормоны, алкалоиды, глюкозиды, флавоноиды и др.

Наличие фитаз в почвенных образцах может быть связано с тем, что фосфор присутствует в почве в виде органических (отложения растительного, животного и микробного происхождения) и неорганических (минеральных) соединений. Из общего количества фосфорных соединений только около 5% доступны растениям. Растения не усваивают органические фосфаты, большая часть которых в почве представлена фитином. Минерализацию этого

[Введите текст]

соединения с образованием доступного растениям фосфатного иона PO_4^{2-} осуществляют образуемые микроорганизмами ферменты – фитазы. Наиболее многочисленной группой продуцентов этих ферментов среди почвенных бактерий являются представители родов *Bacillus*. Также фитазы были обнаружены у бактерии семейства *Enterobacteriaceae*: *E coli*, *Klebsiella terrigena* (*Raoultella terrigena*), *Klebsiella pneumonia* [100] и *Citrobacter freundii* [101]. Кроме того, было показано, что источниками фитаз могут быть и грибы [102]. Более 200 грибных изолятов секретировавших фитазу принадлежали к *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* и *Rhizopus*. Наибольшую секреторную активность показал *Aspergillus niger*.

Было показано, что многие бактерии, грибы и дрожжи обладают фитазной активностью [100]. В работе исследовалась способность микроорганизмов из различных типов почв продуцировать фитазу. Оказалось, что бактериальные клетки экспрессировали только внутриклеточную активность. Исключением были *Lactobacillus amylovorus*, *Bacillus subtilis* and *Enterobacter* sp.4.

Общепринятым методом культивирования микроорганизмов является использование чашек Петри или многолуночных планшетов, заполненных специализированной питательной средой. Альтернативой такого метода культивирования служат более сложные подходы выделения новых микроорганизмов из многокомпонентных сред обитания. Эти методы включают использование микроманипуляторов и оптических лазерных пинцетов [103], имитирование условий природной среды в лаборатории [104] и инкапсуляцию клеток в гелевых микрокаплях [105]. Однако такие подходы являются очень специализированными и требовательными к техническому оснащению лаборатории.

Наряду с упомянутыми высокотехнологичными методиками опубликованы простые, легко реализуемые и при этом эффективные подходы для культивирования новых почвенных микроорганизмов на платах с использованием специализированных сред [106]. В частности, один из

[Введите текст]

подходов, увеличивающих уровень выживаемости сложнокультивируемых штаммов, заключается в замене традиционных богатых питательными веществами сред олиготрофными средами, что предотвращает чрезмерный рост быстрорастущих микроорганизмов и позволяет культивировать уникальные популяции [107]. Учитывая специфику текущего технического оснащения и принимая во внимание поставленную в работе задачу оптимизации методик детекции ферментативной активности и подходов для количественного определения секреторной и внутриклеточной активностей их ферментов гидролитического типа, на начальном этапе работы применяли получившие наибольшее распространение методы культивирования и селекции на микробиологических чашках.

2.2 Процесс экспериментальных исследований

2.2.1. Сбор образцов почв

Сбор образцов почв производился в городской черте г. Санкт-Петербурга и Ленинградской области, Псковской, Тверской, Новгородской, Ростовской областях, в Краснодарском и Приморском краях.

Пробы собирали с поверхностных слоёв почвы глубиной 0 – 20 см. на приусадебных участках, лесных массивах, на агрополях, в городской черте в зонах ризосферы, ризоплана, лесной подстилки, а также из компостов. Всего было отобрано 52 образца почв. Ниже приведены географическое расположение мест сбора, указаны горизонты сбора почвенных образцов, а также прочие источники происхождения исследованных образцов.

Образец №1: городской черте г. Санкт-Петербурга, парк Сосновка; лесная подстилка.

Образец №2: Ленинградская обл., пос. Токсово; зона ризоплана растения горец сахалинский

Образец №3: Ленинградская обл., пос. Токсово; зона ризоплана растения пырей.

[Введите текст]

Образец №4: Ленинградская обл., пос. Токсово; поверхностный слой почвы на некультивируемой зоне приусадебного участка.

Образец №5: Ленинградская обл., пос. Токсово; под грибом сыроежка.

Образец №6: Ленинградская обл., пос. Токсово, приусадебный участок; зоне ризоплана растения настурция.

Образец №7: зона зароста твёрдой фитазной среды.

Образец №8: Ленинградская обл., пос. Токсово; зона ризоплана растения папоротник, растущего на границе болота.

Образец №9: Ленинградская обл., пос. Вырица; поверхностный слой культивируемой почвы на приусадебном участке.

Образец №10: Ленинградская обл., пос. Вырица; лесная подстилка под елью.

Образец №11: городская черта г. Санкт-Петербурга, Суздальский пр.; подстилка газона вдоль автотрассы.

Образец №12: Ленинградская обл., пос. Токсово; лесная подстилка ельника.

Образец №13: Ленинградская обл., пос. Сосново; компост 1.

Образец №14: Ленинградская обл., пос. Сосново; компост 2.

Образец №15: Ленинградская обл., пос. Сосново; компост 3.

Образец №16: квас домашнего изготовления.

Образец №17: сусло домашнего изготовления.

Образец №18: Приморский край, остров Русский, бухта Аякс; лесная подстилка 1.

Образец №19: Приморский край, остров Русский, мыс Тобизина; лесная подстилка дубовой рощи.

Образец №20: Приморский край, остров Русский, бухта Аякс; лесная подстилка 2.

Образец №21: Приморский край, г. Владивосток, мыс Токаревского; поверхностный слой прибрежной почвы.

Образец №22: Краснодарский край; подстилка кукурузного поля.

Образец №23: Краснодарский край; подстилка виноградника.

Образец №24: Ростовской обл.; подстилка поля подсолнечника.

[Введите текст]

Образец №25: Краснодарский край; подстилка арбузной бахчи.

Образец №26: городская черта г. Санкт-Петербург, Дунайский пр.; подстилка газона.

Образец №27: городская черта г. Санкт-Петербург, Дунайский пр.; зона ризосферы пырея, растущего на газоне.

Образец №28: городская черта г. Санкт-Петербург, Дунайский пр.; зона ризосферы пырея, растущего рядом с одуванчиком на газоне.

Образец №29: городская черта г. Санкт-Петербург, Дунайский пр.; зона ризосферы одуванчика, растущего рядом с пырем на газоне.

Образец №30: городская черта г. Санкт-Петербург, Дунайский пр.; зона ризосферы одуванчика, растущего на газоне.

Образец №31: Ленинградская обл., пос. Токсово, приусадебный участок; зона ризоплана растения лилия.

Образец №32: городская черта г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., СПбПУ; подстилка газона.

Образец №33: Ленинградская обл., пос. Токсово, приусадебный участок; подстилка газона с растением сныть.

Образец №34: Ленинградская обл., пос. Токсово, приусадебный участок; поверхностный слой почвы на границе с фундаментом дома.

Образец №35: Ленинградская обл., пос. Токсово, лесной массив; ризосфера растения хвощ.

Образец №36: Ленинградская обл., Лужский р-н, оз. Черемонец; подстилка дубового леса, ризосфера растения сныть

Образец №37: Псковская обл., г. Изборск, Словенские ключи; ризосфера растения сурепка.

Образец №38: Псковская обл., г. Изборск, Словенские ключи; массив лиственного леса, частично разложившаяся подстилка.

Образец №39: Псковская обл., г. Пушкинские горы, р. Великая; подводный прибрежный ил.

[Введите текст]

Образец №40: Псковская обл., Пушкиногорский р-н, оз. Белогули; ризосфера прибрежных камышей.

Образец №41: Тверская обл., Осташковский р-н., оз. Тряское; с корней прибрежного растения кувшинка.

Образец №42: Тверская обл., Осташковский р-н., вблизи оз. Тряское; ризосфера корней гриба колпак кольчатый.

Образец №43: Ленинградская обл., Всеволожский р-н, вблизи оз. Медное; лесная подстилка.

Образец №44: закваска плодовых тел грибов.

Образец №45: Псковская обл., г. Печоры; квас фермерского производства.

Образец №46: Ленинградская обл., Всеволожский р-н, пос. Елизаветинка, лесная зона; помёт лося.

Образец №47: городская черта г. Санкт-Петербург, м. Политехническая; подстилка газона.

Образец №48: Тверская обл., Осташковский р-н., оз. Селигер, о. Столбной; ризосфера прибрежного растения подорожник.

Образец №49: Тверская обл., Осташковский р-н., оз. Селигер, о. Столбной; ризосфера прибрежного растения купальница.

Образец №50 Новгородская обл., г. Старая Русса, парковая зона; ризосфера растения манжетка в липовой роще.

Образец №51 Новгородская обл., г. Старая Русса; донные отложения грязелечебницы.

Образец №52 Псковская обл., прибрежная зона оз. Спастер; ризосфера растения одуванчик.

2.2.2 Получение изолятов микроорганизмов из образца почвы

Для получения накопительной культуры природных изолятов 1 г почвы суспендировали в 5 мл стерильной воды. Затем полученные суспензии

[Введите текст]

высевали истощающимся штрихом на две твёрдые среды: LB и YPD. Платы со средой LB инкубировали при 37 °С в течение суток. Платы со средой YPD инкубировали от одного до нескольких дней. Выросшую накопительную культуру с каждой платы расчищали до отдельных колоний на твёрдых средах LB и YPD соответственно. Далее отдельные колонии рассевали на селективные среды для выявления ферментативной активности.

2.2.3 Методики детекции ферментативной активности микроорганизмов на твёрдых селективных средах

Фитазная активность. Для определения фитазной активности изоляты высеивали на чашки со стерильной твёрдой средой следующего состава: 1.5% D-глюкозы, 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05% KCl, 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01% NaCl, 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.001% FeSO_4 , 0.001% MnSO_4 , pH 7,0 с 0.5% фитатом натрия (Sigma) (единственный источник углерода). Платы инкубировали при температуре 30 °С в течение 5-ти дней. Активность определяли по зоне просветления (гало) вокруг колоний.

2.2.4 Методика детекции секреторной и внутриклеточной фитазной ферментативной активности микроорганизмов

Изоляты растили в 5мл жидкой среды LB или YPD в течение суток при 30°С. Затем культуральную жидкость центрифугировали 15 мин при 6000 об/мин при 6°С. Секреторную фитазную активность определяли в супернатанте, а внутриклеточную – в клеточных лизатах.

Приготовление клеточных лизатов. Осадки подвергали пятикратной процедуре замораживания-оттаивания при -80°С, ресуспендировали в 0,2 М Na-ацетатном буфере, pH 5.5, добавляли лизоцим в концентрации 1 мг/мл, инкубировали 30 мин при комнатной температуре и разрушали ультразвуком (22 кГц). Клеточный лизат центрифугировали 15 мин при 13000 об/мин.

[Введите текст]

Активность фермента. Активность фермента определяли по количеству высвободившегося фосфора при гидролизе фитата натрия.

Реакционная смесь содержала 60 мкл. образца, 8мкл 50мМ фитата натрия в 0,2М натрий-ацетатном буфере рН 5,5 и 332 мкл 0,2м натрий-ацетатного буфера. После инкубации в течение 30 минут при 37°C реакцию останавливали добавлением равного объёма 15% ТХУ. Далее из этой смеси отбирали 100 мкл и добавляли 900 мкл 0,65% молибдата аммония в 2,4% H₂SO₄, содержащую 1% аскорбиновой кислоты. После инкубации в течение 20 минут при 50°C наличие неорганического фосфора в пробах определяли по увеличению оптической плотности измеренной на длине волны 820 нм. Концентрацию белка в лизате определяли методом Брэдфорда.

2.2.5 Выделение высокомолекулярной хромосомной ДНК для филогенетической 16S-идентификации и полногеномного секвенирования микробных природных изолятов

Высокомолекулярную ДНК из отобранных микроорганизмов выделяли с использованием следующей процедуры. Культуру клеток выращивали в 3 мл подходящей жидкой среды (LB, YТ2 или YPD) в течение ночи при температуре 32°C или 37°C при постоянном перемешивании. Клетки из полученной суспензии осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 500 мкл буфера TE и обрабатывали лизоцимом в ледяной бане в течение 30 минут. После последовательного добавления РНКазы (50 мкг/мл), додецилсульфата натрия (0,2%) и протеиназы К (100 мкг/мл) лизаты инкубировали при 55°C в течение ночи и проводили экстракцию фенол-хлороформной смесью. Затем образцы центрифугировали при комнатной температуре и отбирали водную фазу для последующего осаждения очищенной хромосомной ДНК с помощью этанола. Полученные препараты ДНК хранили при температуре -20°C. Степень очистки контролировали

[Введите текст]

электрофорезом в 1% агарозном или в 6% полиакриламидном гелях, а также с помощью спектрофотометрического анализа. При необходимости выполняли дополнительную очистку препаратов с помощью повторной обработки протеиназой К, фенольной экстракции и этанольной преципитации с выматыванием высокомолекулярной ДНК из спиртового раствора.

2.2.6 Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) фрагментов 16S рибосомной РНК для проведения филогенетической идентификации природных изолятов

Аmplификацию фрагментов гена 16S рРНК исследуемых изолятов проводили на термоциклере T100 (BioRad) с использованием 30 циклов, состоящих из стадий денатурации ДНК (30 сек 94°C), отжига праймеров (30 сек 55°C) и, собственно, реакции полимеризации (72 сек 40°C) в тонкостенных 200-мкл пробирках. 50 мкл реакционной смеси содержали: 1-кратный полимеразный буфер, 2.5 mM MgCl₂, 200 мкМ dNTP и 1 ea Taq-полимеразы. Праймеры, структура которых представлена в Таблице 3.1, добавляли по 5 пкмоль каждого в расчете на одну реакцию. Препараты хромосомной ДНК перед добавлением в ПЦР разводили от 100 до 1000 раз в зависимости от исходной концентрации.

Примеры результатов ПЦР представлены на рисунке 1. Полученные образцы фрагментов гена 16S рРНК отправляли на секвенирование по Сэнгеру в компанию «Евроген» (Москва). Полученные результаты анализировали с помощью программы BLAST (NCBI).

Таблица 1. Структура частично вырожденных олигонуклеотидов, выбранных для амплификации фрагментов гена 16S рРНК с целью филогенетического генотипирования.

[Введите текст]

Название олигонуклеотида (праймера)	Последовательность	Длина
16S-27F	5'–AGAGTTTGATYMTGGCTCAG–3'	20
16S-515R	5'–TTACCGCGGCKGCTGGCAC–3'	19
16S-515F	5'–GTGCCAGCMGCCGCGGTAA–3'	19
16S-799F	5'–AACMGGATTAGATACCCCKG–3'	19
16S-1193R	5'–ACGTCATCCCCACCTTCC–3'	18

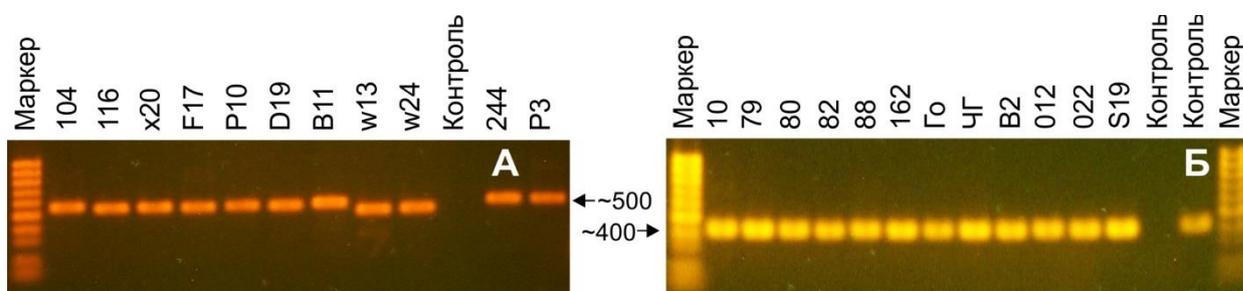


Рисунок 1 – Примеры амплификации участков генов 16S РНК у различных природных изолятов по результатам разделения в 1% агарозном геле. Фрагменты V1-V2-V3 (~500 пн) при проведении ПЦР с участием праймеров 27F и 515R (А); фрагменты V5-V6-V7 (~400 пн) амплифицировали с участием пары праймеров 799F и 1193R (Б).

3 Результаты

3.1 Результаты скрининга изолированных микроорганизмов

После расчистки накопительных культур выделили 446 природных изолятов, которые проверили на твёрдой селективной среде на наличие фитазной активности. (Рисунок 2)

[Введите текст]

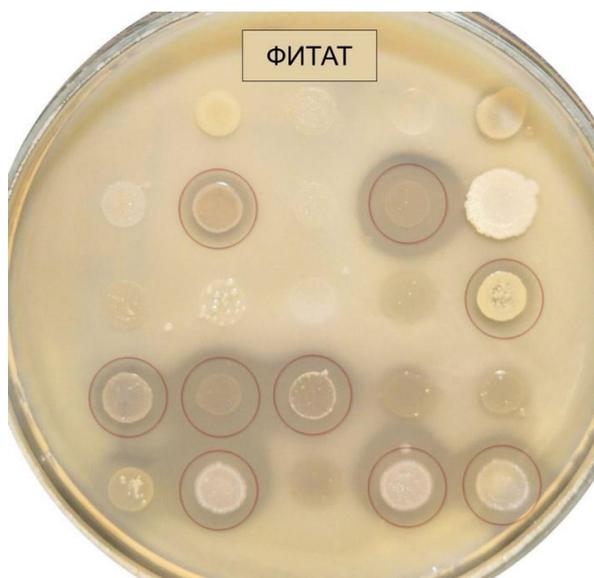


Рисунок 2 – Проверка изолятов на наличие фитазной активности. Наличие зоны просветления вокруг колонии (отмечены кругами) указывает на способность микроорганизма расщеплять фитат.

Таким образом, первичный скрининг по детекции ферментативной активности показал, что фитазная активность наблюдается у 188-и изолятов. 117 изолятов, продемонстрировавших наибольшую фитазную активность, были законсервированы для дальнейших исследований.

Наибольшее количество изолятов, демонстрировавших высокую фитазную активность, было обнаружено в образцах, собранных в лесных массивах. Образцы почв с приусадебных участков немного уступали по относительному количеству изолятов с высокой фитазной активностью образцам, собранным в городской среде. Образцы, собранные с агрополей, отличались самой низкой фитазной активностью. По наличию изолятов с высокой фитазной активностью почва из компостов значительно уступала почве, отобранной на приусадебных участках и в городской черте. (Рисунок 3)

[Введите текст]

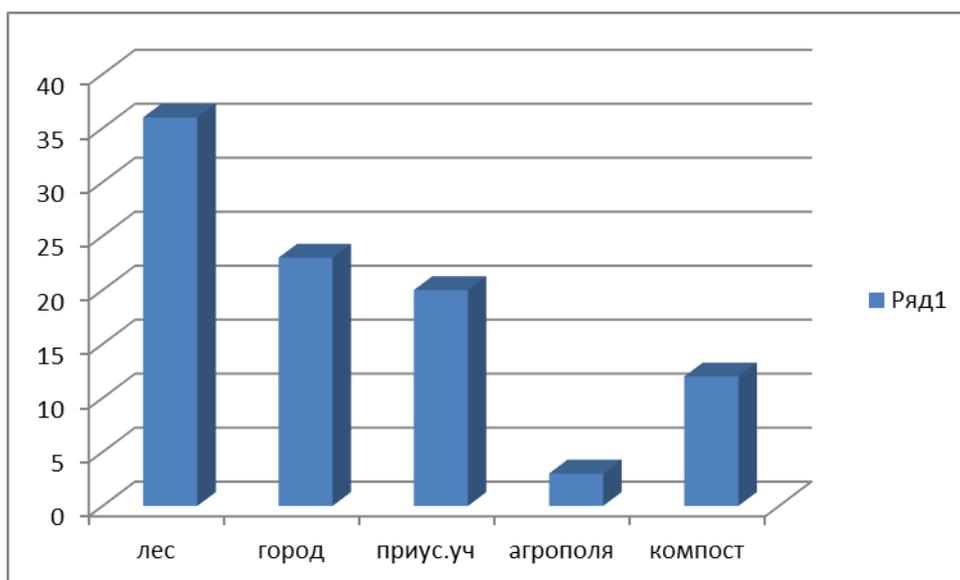


Рисунок 3. Распределение фитазной активности микроорганизмов по почвам различного происхождения. По оси абсцисс – участки сбора образцов почв, по оси ординат – процентное содержание изолятов с определённой активностью относительно общего количества.

3.2 Проверка изолятов, на наличие секреторной и внутриклеточной фитазной активности

Провели апробацию четырёх методов для определения неорганического фосфора (Лоури и Лопесу, Лоури и Лопесу в модификации Скулачёва, с использованием хлорида железа (II), молибдата аммония и серной кислоты). Для определения наличия у микроорганизмов фитазной активности выбрали метод Лоури и Лопесу как наиболее удобный в постановке и дающий воспроизводимые результаты.

Провели проверку 17-ти изолятов, показавших фитазную активность на твёрдой селективной среде, на способность экспрессировать фитазу в жидкой культуральной среде. Оказалось, что ни один изолят не обладал секреторной активностью. Только у 9-ти изолятов удалось вскрыть клетки и определить внутриклеточную ферментативную активность. Результаты измерений приведены на рис. 4

[Введите текст]

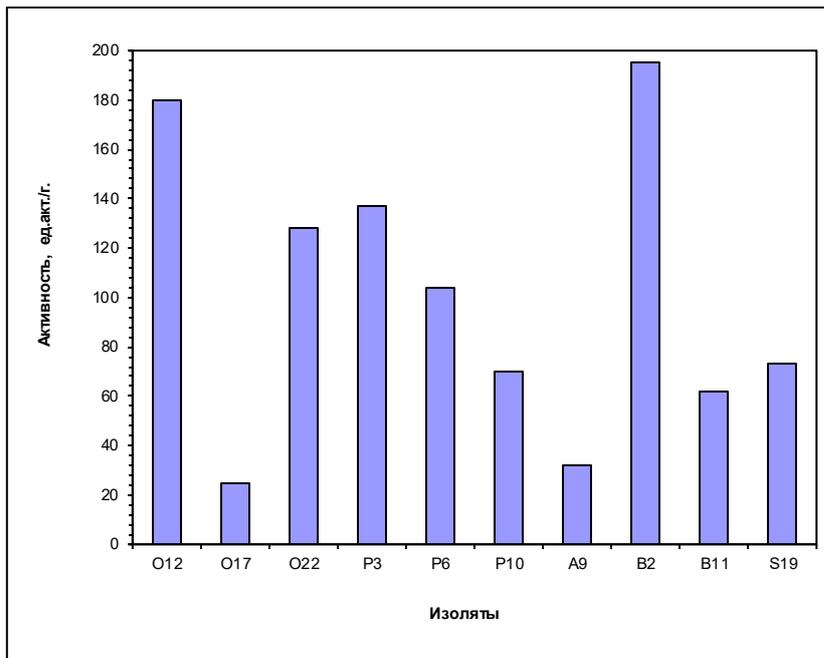


Рисунок 4. – Фитазная активность, ед. акт./г общего белка в лизате при рН 5,5

У 4-х изолятов В2, Р10, О12 и Р3 определили рН зависимость активности при 7-ми различных значениях рН: 1,9; 2,5; 4,1; 4,5; 5,5; 6,0; 6,5 (рис. 5).

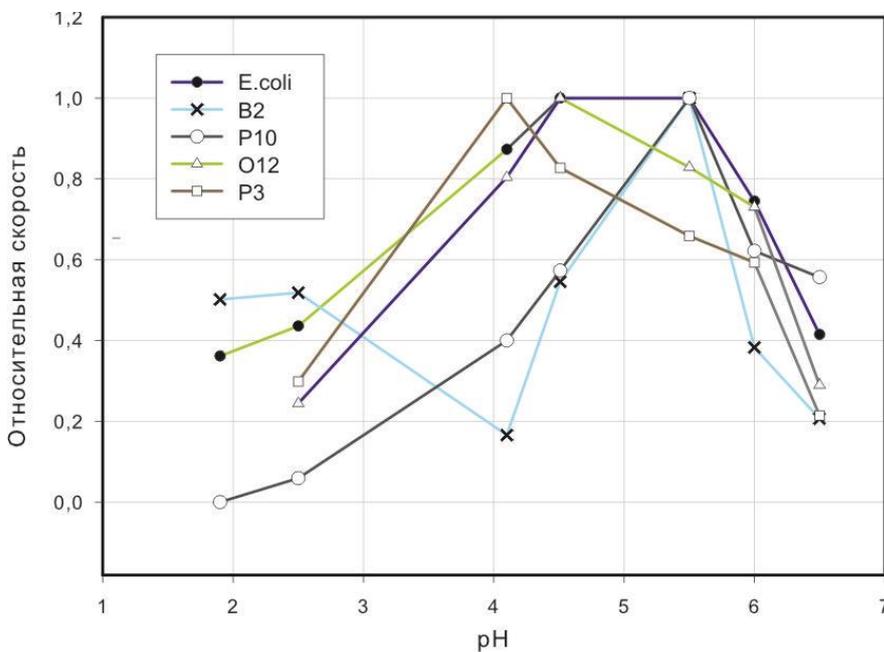


Рисунок 5. – Относительная фитазная активность, в лизате четырёх микроорганизмов в зависимости от рН. Для сравнения измерили относительную фитазную активность *E. coli*.

[Введите текст]

Показали, что у четырёх протестированных изолятов рН оптимум фитазной активности находится в кислой области. Вероятно, это кислые фитазы. Кроме того, у изолята В2 определили 2 пика активности: при рН 5,5 и 2,5.

3.3. Выделение высокомолекулярной хромосомной ДНК

Из наработанной клеточной биомассы 4-х отобранных микроорганизмов с высокой фитазной ферментативной активностями методом фенольной экстракции выделили хромосомную ДНК для дальнейшего проведения филогенетического анализа. Типичные примеры результатов такого выделения представлены на рисунке 6.

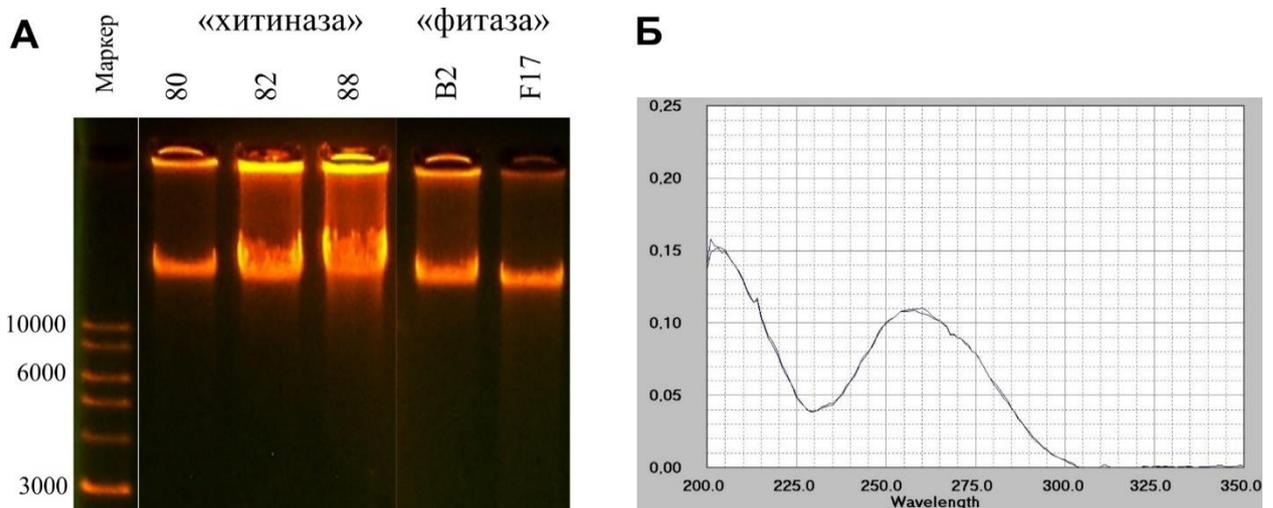


Рисунок 6. – Примеры анализа препаратов хромосомной ДНК, выделенных из природных изолятов, демонстрирующих фитазную и хитиназную активности. А – Электрофорез в агарозном геле с окраской бромистым этидием. Б – Оценка чистоты и концентрации ДНК в препарате из изолята В2.

3.4 Идентификация родовой принадлежности отобранных микроорганизмов по последовательности 16S рРНК

[Введите текст]

Для проведения филогенетического анализа выбрали три пары олигонуклеотидов для амплификации переменных участков V1-V3 и V4-V7 гена 16S-рибосомной РНК бактериальных изолятов (рисунок 7).

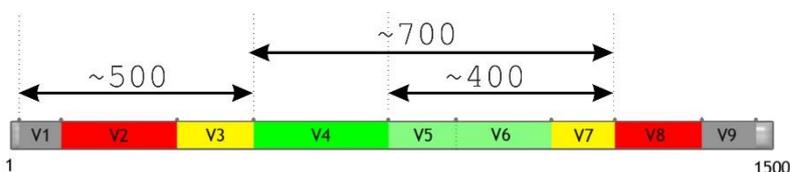


Рисунок 7. – Схема выбранных областей гена 16S-рибосомной РНК для проведения филогенетической родовой идентификации отобранных изолятов-продуцентов.

На данный момент провели амплификацию и секвенирование областей V1-V3 и V5-V7 гена 16S рРНК, что позволило провести филогенетическую идентификацию 4 отобранных микроорганизмов (рисунок 8.).

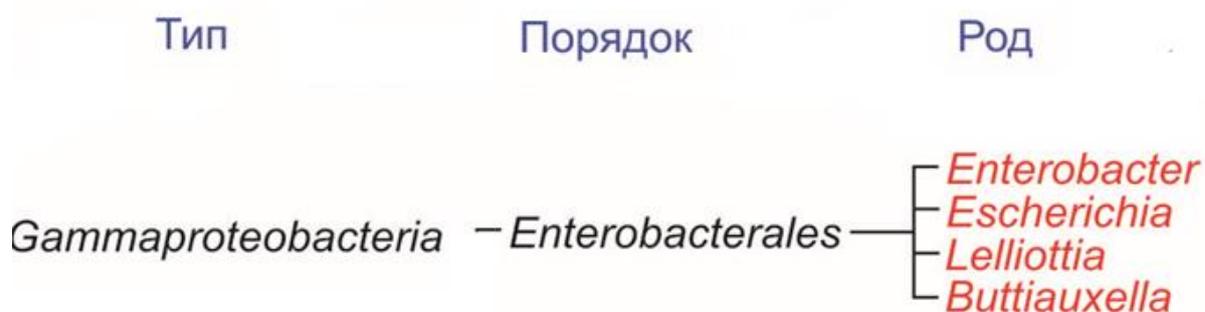


Рисунок 8. – Родовая принадлежность отобранных для дальнейшего исследования природных изолятов.

3.5 Подготовка образцов хромосомной ДНК для полногеномного секвенирования (NGS)

На рисунке 9 и в таблице 2 представлены результаты дополнительной очистки и характеристики препаратов ДНК из 12 отобранных

[Введите текст]

микроорганизмов для проведения полногеномного секвенирования с указанием их предварительной филогенетической 16S-идентификации.

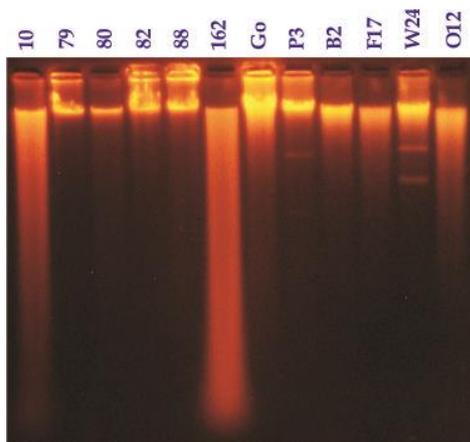


Рисунок 9. – Электрофорез в 1% агарозном геле очищенных препаратов геномной ДНК с окраской бромистым этидием.

Таблица 2. – Характеристики образцов хромосомной ДНК, отобранных для NGS.

№	Образец	Концентрация, нг/мкл	260 / 280	260 / 230	Кол-во, мкг	Предварительная 16S-идентификация
1	P3 (Ф)	106	1.85	> 2	11	<i>Buttiauxella sp.</i>
2	B2 (Ф)	82	1.80	> 2	8	<i>Escherichia sp.</i>
3	F17 (Ф)	45	1.80	> 2	4,5	<i>Lelliottia sp.</i>
4	O12 (Ф)	145	1.80	> 2	14,5	<i>Enterobacter sp.</i>

Заключение

Целью данной работы являлось создание выборки микроорганизмов, продуцирующих фитазы, перспективные для применения в животноводстве и биоэтанольном производстве. Актуальность цели работы подтверждается

[Введите текст]

необходимостью совершенствования существующих и созданию новых эффективных биотехнологических процессов, связанных как с переработкой биомассы, так и научными разработками.

В результате выполнения работы были получены следующие результаты. Исследовали 52 образца почв, отобранных в городской среде г. Санкт-Петербурга, Ленинградской, Псковской, Тверской, Новгородской, Воронежской областях, а также Краснодарском и Приморском краях, из которых выделили 495 природных изолятов микроорганизмов.

Первичный скрининг по детекции ферментативных активностей на твёрдых селективных средах показал, что фитазная активность обнаруживается у 188-и изолятов микроорганизмов. Изоляты, показавшие наибольшую фитазную активность, были законсервированы для дальнейших исследований (117 изолятов).

У 17-ти изолятов, показавших при первичном скрининге фитазную активность, секреторная активность в культуральной среде отсутствовала. У 9-ти изолятов количественно охарактеризовали внутриклеточную ферментативную активность.

У 4-х изолятов определили рН зависимость фитазной активности. У всех проверенных изолятов рН оптимум фитазной активности находился в кислой области.

Провели выделение высокомолекулярной хромосомной ДНК из 4 отобранных микроорганизмов с высокой фитазной активностью. Подготовленные образцы генов 16S-рРНК просеквенировали и определили родовую принадлежность 4 отобранных микроорганизмов. Отобранные микроорганизмы отнесли к родам: *Buttiauxella sp.*, *Escherichia sp.*, *Lelliottia sp.*, *Enterobacter sp.*.

Образцы хромосомной ДНК отобранных микроорганизмов подготовили и передали в НИЦ «Курчатовский институт» для проведения полногеномного секвенирования (NGS).

[Введите текст]

Создана выборка микроорганизмов-продуцентов фитазы, играющих важную роль в современных биотехнологических процессах глубокой переработки возобновляемого сырья и производства кормовых добавок для животных.

Список опубликованных работ

- 1) Сборник V всероссийского молодежного научного форума «Open Science 2018» «Сдвиг рН-оптимума глюкоамилазы гриба *Aspergillus awamori* X100 методами направленной эволюции» Е. В. Соболева, А. Е. Шмидт, Д. С. Виноградова, В. Р. Сергеев, М. А. Суржик стр. 55
- 2) Сборник докладов «Неделя Науки» 2019 «Создание термостабильных химерных форм глюкоамилазы с помощью *in vitro* рекомбинации» Соболева Е.В., Шмидт А.Е., Виноградова Д.С., Сергеев В.Р., Суржик М.А. стр. 298-301
- 3) Сборник лучших докладов «Неделя Науки» 2019 «Использование *in vitro* рекомбинации для получения термостабильной химерной формы глюкоамилазы» Шмидт А.Е., Соболева Е.В., Виноградова Д.С., Сергеев В.Р., Суржик М.А. стр. 235-238
- 4) Статья Journal: Protein Engineering, Design, and Selection 2019, Pages 251–259 «Thermostability improvement of *Aspergillus awamori* glucoamylase via directed evolution of its gene located on episomal expression vector in *Pichia pastoris*» Alexander Schmidt, Alexey Shvetsov, Elena Soboleva, Yury Kil, Vladimir Sergeev, Marina Surzhik

Список цитируемой литературы

1. Lei X. G., Stahl C. H. Nutritional benefits of phytase and dietary determinants of its efficacy // Journal of Applied Animal Research. – 2000. – Т. 17, № 1. – С. 97-112.
2. Lei X. G., Stahl C. H. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2001. – Т. 57, № 4. – С. 474-481
3. Carrington A. L., Calcutt N. A., Ettlinger C. B., Gustafsson T., Tomlinson D. R. Effects of treatment with myo-inositol or its 1,2,6-trisphosphate (PP56) on nerve conduction in streptozotocin-diabetes // European Journal of Pharmacology. – 1993. – Т. 237, № 2-3. – С. 257-263
4. Claxson A., Morris C., Blake D., Siren M., Halliwell B., Gustafsson T., Löfkvist B., Bergelin I. The anti-inflammatory effects of D-myo-inositol-1,2,6-trisphosphate (PP56) on animal models of inflammation // Agents and Actions. – 1990. – Т. 29, № 1-2. – С. 68-70
5. Maffucci T., Piccolo E., Cumashi A., Iezzi M., Riley A. M., Saiardi A., Godage H. Y., Rossi C., Brogгинi M., Iacobelli S., Potter B. V. L., Innocenti P., Falasca M. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by inositol pentakisphosphate results in antiangiogenic and antitumor effects // Cancer Research. – 2005. – Т. 65, № 18. – С. 8339-8349.
6. Maga, J. A. 1982. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. J. Agric. Food Chem. 30:1–9

7. Sandberg, A. S., Larsen, T., and Sandstorm, B. 1993. High dietary calcium level decreases phytate degradation in pigs fed a rapeseed diet. *J. Nutr.* 123: 559–566
8. Mellanby, E. 1949. The rickets producing and anticalcifying action of phytate. *J. Physiol. (London)* 109: 488–493
9. Davies, N. T. and Nightingale, R. 1975. The effects of phytate on intestinal absorption and secretion of zinc and whole body retention of zinc, copper, iron and manganese in rats. *Br. J. Nutr.* 34: 243–258
10. O'Dell, B. L. and Savage, J. E. 1960. Effect of phytic acid on zinc availability. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103: 304
11. Dvorakova, J. 1998. Phytase: Sources, preparation and exploitation. *Folia Microbiol.* 43(4): 323–338
12. Thompson, L. U. and Yoon, J. H. 1984. Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *J. Food Sci.* 49: 1228–1229
13. Harland, B. F. and Morris, E. R. 1995. Phytate: A good or a bad food component. *Nutr. Res.* 15(5): 733–754
14. Wodzinski, R. J. and Ullah, A. H. J. 1996. Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42: 263–302
15. Abelson, P. H. 1999. A potential phosphate crisis. *Science* 283: 2015
16. Yao, M.Z., Zhang, Y.H., Lu, W.L., Hu, M.Q., Wang, W., and Liang, A.H. (2011) Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications, *Appl. Microbiol.*, 112, 1–14.
17. Johnson, L. F. and Tate, M. E. 1969. The structure of myo-inositol pentaphosphates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 165: 526–532
18. Cosgrove, D. J. 1969. Ion exchange chromatography of inositol polyphosphates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 165: 677–686
19. Cosgrove, D. J. 1970. Inositol phosphates of microbial origin. Inositol phosphate intermediates in the dephosphorylation of the hexaphosphates of myo-inositol, scyllo-inositol, and D-chiro-inositol by a bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. *Austral. J. Biol. Sci.* 23: 1207–1220
20. Chang, C. W. 1967. Study of phytase and fluoride effects in germinating corn seeds. *Cereal Chem.* 44: 129–142
21. Eskin, N. A. M. and Wiebe, S. 1983. Changes in phytate activity and phytase during germination of two fababean cultivars. *J. Food Sci.* 48: 270–271
22. Gibson, D. M. and Ullah, A. H. J. 1990. Phytases and their action in phytic acid. In: *Inositol Metabolism in Plants*. pp. 77–92. Wiley-Liss, Chichester
23. Greene, D. A., De Jesus, P. V., and Winegrad, A. I. 1975. Effects of insulin and dietary myo-inositol on impaired peripheral motor nerve conduction velocity in acute streptozotocin diabetes. *J. Clin. Invest.* 55: 1326–1336
24. Mullaney, E. J., Daly, C. B., and Ullah, A. H. J. 2000. Advances in phytase research. *Adv. Appl. Microbiol.* 47: 157–199
25. Laboure, A. M., Gagnon, J., and Lescure, A. M. 1993. Purification and characterization of a phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*zea mays*) seedlings during germination. *Biochem. J.* 295: 413–419
26. Maugenest, S., Martinez, I., and Lescure, A. M. 1997. Cloning and characterization of a cDNA encoding a maize seedling phytase. *Biochem. J.* 322: 511–517
27. Liu, B., Rafiq, A., Tzeng, Y., and Rob, A. 1998. The induction and characterization of phytase and beyond. *Enz. Microb. Technol.* 22: 415–424
28. Rapoport, S., Leva, E., and Guest, G. M. 1941. Phytase in plasma and erythrocytes of vertebrates. *J. Biol. Chem.* 139: 621–632

29. Patwardhan, V. N. 1937. The occurrence of a phytin splitting enzyme in the intestines of albino rats. *Biochem. J.* 31: 560–564
30. Spitzer, R. S. and Phillips, P. H. 1972. Cited in K. Bitar, J. G. Reinhold. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf and man. *Biochim. Biophys. Acta* 268: 442–452
31. Bitar, K. and Reinhold, J. G. 1972. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf and man. *Biochim. Biophys. Acta* 268: 442–452
32. Iqbal, T. H., Lewis, K. O., and Cooper B. T. 1994. Phytase activity in the human and rat small intestine. *Gut* 35: 1233–236
33. Berka, R. M., Rey, M. W., Brown, K. M., Byun, T., and Klotz, A. V. 1998. Molecular characterization and expression of a phytase gene from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4423–4427
34. Ghosh, S. 1997. Phytase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. M.Sc dissertation, Department of Microbiology, University of Delhi, Delhi
35. Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M., and van Loon, A. P. G. M. 1997. Gene cloning, purification and characterization of a heat stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(5): 1696–1700
36. Casida, L. E. Jr. 1959. Phosphatase activity of some common soil fungi. *Soil Sci.* 87: 305–310
37. Segueilha, L., Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G., and Galzy, P. 1992. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. *J. Ferment. Bioeng.* 74(1): 7–11
38. Sano, K., Fukuhara, H., and Nakamura, Y. 1999. Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*. *Biotechnol. Lett.* 21: 33–38
39. Nakamura, Y., Fukuhara, H., and Sano, K. 2000. Secreted phytase activities of yeasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 (4): 841–844
40. Vohra, A. and Satyanarayana, T. 2002. Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala*. *Process Biochem.* 37: 999–1004
41. Shieh, T.R. and Ware, J. H. 1968. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol.* 16(9): 1348–1351
42. Kim, Y. O., Kim, H. K., Bae, K. S., Yu, J. H., and Oh, T. K. 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enz. Microb. Technol.* 22: 27
43. Sreeramulu, G., Srinivasa, D. S., Nand, K., and Joseph, R. 1996. *Lactobacillus amylovorus* as a phytase producer in submerged culture. *Letts. ppl. Microbiol.* 23: 385–388
44. Yoon, S. J., Choi, Y. J., Min, H. K., Cho, K. K., Kim, J. W., Zee, S. C., and Jung, Y. H. 1996. Isolation and identification of phytase producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4 and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enz. Microb. Technol.* 18: 449–454
45. Kerovuori, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., and Apajalahti, J. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2079–2085
46. Greaves, M. P., Anderson, G., and Webley, D. M. 1967. The hydrolysis of inositol phosphates by *Aerobacter aerogenes*. *Biochim. Biophys. Acta* 132: 412–418

47. Irving, G. C. J. and Cosgrove, D. J. 1971. Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin. Some properties of a partially purified bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. *Aust. J. Biol. Sci.* 24: 547–557
48. Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G., and Galzy, P. 1992. Utilization of phytate by some yeasts. *Biotechnol. Lett.* 14(1): 63–66
49. Powar, V. K. and Jagannathan, V. 1967. Phytase from *Bacillus subtilis*. *Indian J. Biochem.* 4: 184–185
50. Yamada, K., Minoda, Y., Kobayashi, T., Hidaka, Y., Matuo, H., and Kobayashi, M. 1968. Phytase from *Aspergillus terreus* I production, purification and some general properties of the enzyme. *Agric. Biol. Chem.* 32: 1275–1282
51. Zytka, K. and Gogol, D. 2002. In vitro efficacies of phosphorolytic enzymes synthesized in mycelial cells of *Aspergillus niger* AbZ4 grown by a liquid surface fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 50(4): 899–905.
52. Howson, S. J. and Davis, R. P. 1983. Production of phytate hydrolysing enzymes by some fungi. *Enz. Microb. Technol.* 5: 377–389.
53. Han, Y. W. and Gallagher, D. J. 1987. Phytase production by *Aspergillus ficuum* on semi-solid substrate. *J. Ind. Microbiol.* 2: 195–200.
54. Ullah, A. H. J. and Gibson, D. M. 1987. Extracellular phytase (EC 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Prep. Biochem.* 17: 63–91.
55. Ebune, A., Al-Asheh, S., and Duvnjak, Z. 1995. Effect of phosphate, surfactants and glucose on phytase production and hydrolysis of phytic acid in canola meal by *Aspergillus ficuum* during solid state fermentation. *Biores. Technol.* 54: 241–247.
56. Quan, C. S., Zhang, L. H., Wang, Y. J., and Ohta, Y. Y. 2001. Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. *J. Biosci. Bioeng.* 92(2): 154–160
57. Wodzinski, R. J. and Ullah, A. H. J. 1996. Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42: 263–302
58. Powar, V. K. and Jagannathan, V. 1982. Purification and properties of phytate specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 151: 1102–1108
59. Greiner, R., Konitzny, U., and Jany, K. D. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 303: 107–113
60. Tambe, S. M., Kakli, S. G., Kelkar, S. M., and Parekh, L. J. 1994. Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: Evidence for unusually small active enzyme peptide. *J. Ferm. Bioeng.* 77(1): 23–27.
61. Yanke, L. J., Selinger, L. B., and Cheng, K. J. 1999. Phytase activity of *Selenomonas ruminantium*: a preliminary characterization. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 20–25
62. Jareonkitmongkol, S., Ohya, M., Watanabe, R., Takagi, H., and Nakamori, S. 1997. Partial purification of phytase from a soil isolate bacterium, *Klebsiella oxytoca* MO-3. *J. Ferm. Bioeng.* 83 (4): 393–394
63. Kerovuori, J., Lappalainen, I., and Reinikainen, T. 2000. The metal dependence of *Bacillus subtilis* phytase. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 268 (2): 365–9
64. Wyss, M. R., Brugger, R., Kronenberger, A., Remy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M. and van Loon, A. P. G. M. 1999. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 367–373

65. Ullah, A. H. J. and Cummins, B. J. 1988. A. ficuum extracellular phytase: Immobilization on glutaraldehyde-activated silicate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 542: 102–106
66. Don Cannon, 2014. How ethanol production technology impacts DDGS value in animal nutrition. 18th Annual Distillers Grains Symposium. Danisco Animal Nutrition, Dallas, TX; DuPont.
67. Jones, F.T., 2011. A review of practical Salmonella control measures in animal feed. *J. Appl. Poult. Res.* 20 (1), 102–113
68. Jones, F.T., Richardson, K.E., 2004. Salmonella in commercially manufactured feeds. *Poult. Sci.* 83, 384–391.
69. Cox, N.A., Burdick, D., Bailey, J.S., Thomson, J.E., 1986. Effect of the steam conditioning and pelleting process on the microbiology and quality of commercial-type poultry feeds. *Poult. Sci.* 65 (4), 704–709.
70. Lewis, L.L., 2011. Evaluation of Pelleting Process Parameters on Feed Nutrients, Starch Gelatinization and Pig Growth Performance (MSc Thesis). Kansas State University.
71. Patridge, G., 2007. New-generation phytase with high thermostability. *PIG Progress* 23 (4).
72. Ushasree, M.V., Krishna, Shyam, Vidya, J., Pandey, A., 2017. Microbial phytase: impact of advances in genetic engineering in revolutionizing its properties and applications. *Bioresour. Technol.* 245 (Pt B), 1790–1799
73. Edens, F.W., Parkhurst, C.R., Ferket, P.R., Havenstein, G.B., Sefton, A.E., 2002. A demonstration of postpellet application of dry phytase to broiler diets. *J. Appl. Poult. Res.* 11 (1), 34–45.
74. Rathnayake, U.A., Senapathi, T., Sandaruwan, C., Gunawardene, S., Karunaratne, V., Kottegoda, N., 2018. Rice bran nanofiber composites for stabilization of phytase. *Chem. Cent. J.* 12 (1), 28.
75. Vandenberg, G.W., Scott, S.L., Sarker, P.K., Dallaire, V.J., de la Noüe, V.J., 2011. Encapsulation of microbial phytase: effects on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Feed Sci. Technol.* 169 (3–4), 230–243.
76. Naghshbandi, M.P., Moghimi, H., Latif, B., 2018. Covalent immobilization of phytase on the multi-walled carbon nanotubes via diimide-activated amidation: structural and stability study. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 8, 1–10.
77. Vieille, C., Zeikus, J.G., 1996. Thermozymes: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. *Trends Biotechnol.* 14 (6), 183–190.
78. Shivange, A.V., Schwaneberg, U., 2017. Recent Advances in Directed Phytase Evolution and rational Phytase Engineering. *Directed Enzyme Evolution: Advances and Applications*. Springer, New York, pp. 145–172.
79. Rebello, S., Jose, L., Sindhu, R., Aneesh, E.M., 2017. Molecular advancements in the development of thermostable phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (7), 2677–2689
80. Ullah, A.H., Mullaney, E.J., 1996. Disulfide bonds are necessary for structure and activity in *Aspergillus ficuum* phytase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227 (2), 311–317.
81. Wang, X.Y., Meng, F.G., Zhou, H.M., 2004. The role of disulfide bonds in the conformational stability and catalytic activity of phytase. *Biochem. Cell Biol.* 82 (2), 329–334.

82. Song, G.Y., Wang, X.Y., Wang, M., 2005. Influence of disulfide bonds on the conformational changes and activities of refolded phytase. *Protein Pept. Lett.* 12 (6), 533–535.
83. Kumar, K., Dixit, M., Khire, J., Pal, S., 2013. Atomistic details of effect of disulfide bond reduction on active site of Phytase B from *Aspergillus niger*: A MD Study. *Bioinformation* 9 (19), 963–967
84. Cheng, C., Wong, K.B., Lim, B.L., 2007. The effect of disulfide bond on the conformational stability and catalytic activity of beta-propeller phytase. *Protein Pept. Lett* 14 (2), 175–183.
85. Tan, H., Wu, X., Xie, L., Huang, Z., Peng, W., Gan, B., 2016b. Identification and characterization of a mesophilic phytase highly resilient to high-temperatures from a fungus-garden associated metagenome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (5), 2225–2241.
86. Zhang, W., Mullaney, E.J., Lei, X.G., 2007. Adopting selected hydrogen bonding and ionic interactions from *Aspergillus fumigatus* phytase structure improves the thermostability of *Aspergillus niger* Phy A phytase. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (9), 3069–3076.
87. Kim, M.S., Weaver, J.D., Lei, X.G., 2008. Assembly of mutations for improving thermostability of *Escherichia coli* AppA2 phytase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 751–758.
88. Kim, M.S., Lei, X.G., 2008. Enhancing thermostability of *Escherichia coli* phytase AppA2 by error-prone PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79 (1), 69–75.
89. Zhao, Q., Liu, H., Zhang, Y., Zhang, Y., 2010. Engineering of protease resistant phytase from *Penicillium* sp.: high thermal stability, low optimal temperature and pH. *J. Biosci. Bioeng.* 110, 638–645
90. Noorbacha, I.A., Sultan, A.M., Salleh, H.M., Amid, A., 2013. Understanding thermostability factors of *Aspergillus niger* Phy A phytase: a molecular dynamics study. *Protein J.* 32 (4).
91. Shivange, A.V., Roccatano, D., Schwaneberg, U., 2016. Iterative key-residues interrogation of a phytase with thermostability increasing substitutions identified in directed evolution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (1), 227–242.
92. Wang, X., Du, J., Zhang, Z.Y., Fu, Y.J., Wang, W.M., Liang, A.H., 2018. A rational design to enhance the resistance of *Escherichia coli* phytase appA to trypsin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
93. Rodriguez, E., Wood, Z.A., Karpus, P.A., Lei, X.G., 2000. Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 382 (1), 105–112.
94. Yao, M.Z., Wang, X., Wang, W., Fu, Y.J., Liang, A.H., 2013. Improving the thermostability of *Escherichia coli* phytase, appA, by enhancement of glycosylation. *Biotechnol. Lett.* 35, 1669–1676.
95. Foster R. C. Microenvironments of soil microorganisms // *Biology and Fertility of Soils.* – 1988. – T. 6, № 3. – C. 189-203.
96. Ranjard L., Richaume A. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil // *Research in Microbiology.* – 2001. – T. 152, № 8. – C. 707-716.
97. Rosselló-Mora R., Amann R. The species concept for prokaryotes // *FEMS Microbiology Reviews.* – 2001. – T. 25, № 1. – C. 39-67

[Введите текст]

98. Øvreås L. Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments // *Ecology Letters*. – 2000. – Т. 3, № 3. – С. 236-251.
99. Torsvik V., Daae F. L., Sandaa R. A., Øvreås L. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments // *Journal of Biotechnology*. – 1998. – Т. 64, № 1. – С. 53-62.
100. Vohra A., Satyanarayana T. Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2003. – Т. 23, № 1. – С. 29-60.
101. 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 Microbiology Letters*. – 2004. – Т. 236, № 2. – С. 283-290.
102. Richardson A. E., Barea J. M., McNeill A. M., Prigent-Combaret C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms // *Plant and Soil*. – 2009. – Т. 321, № 1-2. – С. 305-339.
103. Fröhlich J., König H. New techniques for isolation of single prokaryotic cells // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2000. – Т. 24, № 5. – С. 567-572.
104. Kaerberlein T., Lewis K., Epstein S. S. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment // *Science*. – 2002. – Т. 296, № 5570. – С. 1127-1129.
105. Zhang Q., Wang T., Zhou Q., Zhang P., Gong Y., Gou H., Xu J., Ma B. Development of a facile droplet-based single-cell isolation platform for cultivation and genomic analysis in microorganisms // *Scientific Reports*. – 2017. – Т. 7. – С. 41192-41192.
106. Joseph S. J., Hugenholtz P., Sangwan P., Osborne C. A., Janssen P. H. Laboratory Cultivation of Widespread and Previously Uncultured Soil Bacteria // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2003. – Т. 69, № 12. – С. 7210-7215.
107. Zengler K., Toledo G., Rappé M., Elkins J., Mathur E. J., Short J. M., Keller M. Cultivating the uncultured // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2002. – Т. 99, № 24. – С. 15681-15686.

Аспирант _____ Соболева Елена Валентиновна