

ГЕНЕТИКА

УДК 579.222.6

В. А. Савинов, Е. В. Самбук, М. В. Падкина

ПРИРОДНЫЕ И РЕКОМБИНАНТНЫЕ ФИТАЗЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Фосфор является одним из самых избыточных элементов литосферы. Гетеротрофные организмы получают фосфор из растений, у которых этот элемент находится главным образом в виде фитатов. Фитаты представляют собой кальциевые и магниевые соли инозитолгексафосфорной кислоты (рис. 1). На фитаты приходится до двух третей всего фосфора в пище, оставшаяся треть представлена легко усвояемым неорганическим фосфором (Фн) [26].

Однако фосфор в составе фитатов в полной мере недоступен человеку и многим сельскохозяйственным животным (например, крупному рогатому скоту, свиньям и домашней птице) из-за отсутствия или недостаточного количества фитатдеградирующих ферментов в желудочно-кишечном тракте.

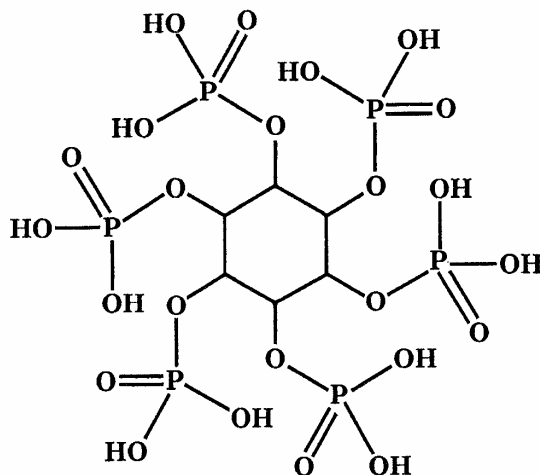


Рис. 1. Фитиновая (инозитолгексафосфорная) кислота.

Кроме того, фитаты из-за сильного отрицательного заряда эффективно связывают ионы кальция, цинка и железа, что резко снижает всасывание этих важных минеральных веществ в кишечнике. Эта особенность фитатов является одной из причин дефицита

железа, от которого страдают более трех миллиардов человек на планете. Образование комплексов фитатов с белками ухудшает питательную ценность кормов. Наконец неусвоенный фосфор, в избытке выделяемый животными в среду, представляет значительную экологическую проблему, так как приводит к эвтрофикации водоемов со всеми губительными последствиями для водных организмов [9].

Именно поэтому возрастает интерес к ферментам, катализирующим отщепление неорганического фосфата от фитатов.

Фитазы. В биологической системе гидролиз фитиновых кислот до *мио*-инозитола и фосфатов считается важной реакцией энергетического обмена, сигнальных и регуляторных путей метаболизма. Фитиновые кислоты и продукты их деградации вовлечены в регуляцию клеточной пролиферации и дифференцировки, контроль уровня глюкозы и холестерина в крови, противоопухолевые процессы, лечение болезней Паркинсона и Альцгеймера [26]. Добавление фитазы в корма увеличивает доступность фитинового фосфора из растительной пищи и одновременно позволяет уменьшить выделение фосфора в среду. Увеличение содержания фитазы в пище человека может повысить доступность ионов железа и цинка.

Фитазы (*мио*-инозитолгексакисфосфатфосфогидролазы) – это особый подкласс кислых фосфатаз (КФ), катализирующих отщепление фосфатов от фитиновых кислот, основной запасной формы фосфора в растительной пище: злаках, бобах и орехах.

Существует две группы фитаз: 3-фитазы (Е.С.3.1.3.8.) или 6-фитазы (Е.С.3.1.3.26), в зависимости от позиции фосфомоноэфирной группы фитиновой кислоты, по которой происходит гидролиз. Наиболее многочисленная и изученная группа фитатдеградирующих ферментов относится к семейству гистидиновых кислых фосфатаз [16]. Так же, как у КФ дрожжей, уровень синтеза фитаз зависит от количества неорганического фосфата в среде [29].

Ферменты этой группы обладают консервативной аминокислотной последовательностью RHGXRRP в активном центре, которая характерна для кислых фосфатаз с высокой молекулярной массой, а также С-концевым HD-мотивом (гистидин в положении 361 и аспаргат в положении 362). В эту группу входят самые известные сегодня фитазы PhyA и PhyB гриба *Aspergillus niger*, синтезируемые клетками в условиях дефицита фосфора. Сюда относятся также КФ Pho3p, Pho5p, Pho11p *Saccharomyces cerevisiae* и Pho1p, Pho4p *Schizosaccharomyces pombe* [33].

С открытием фитазы особую важность приобретает изучение биохимических свойств ферментов различного происхождения. Поскольку фитаза служит пищевой добавкой для животных, важными свойствами фермента являются высокая специфическая активность, широкая субстратная специфичность, стабильность в широком диапазоне pH, стабильность при хранении, дражировании корма и прохождении через пищеварительный тракт. Устойчивость к высоким температурам является наиболее важной характеристикой, так как дражирование корма обычно происходит при температуре 65–95 °С [31]. Во многих лабораториях мира ведется активный поиск новых удобных источников фитазы, разработка путей оптимизации синтеза этого белка и способов минимизации затрат на его производство в промышленных масштабах. Развитие микробных систем экспрессии гетерологичных генов делает доступным широкомасштабное производство фитазы по относительно низкой цене. К концу XX в. годовые продажи фитазы в качестве кормовой добавки были оценены в размере 500 млн долларов США, при этом они продолжают расти [26].

Таким образом, в настоящее время микроорганизмы, продуцирующие фитазы, привлекают большее внимание и приобретают большую ценность в пищевой промышленности и на рынке кормовых добавок для животных.

В природе фитазы обнаружены у грибов, бактерий и в семенах многих растений. Структурные гены фитаз были идентифицированы и выделены из грибов, бактерий и растений. Эти гены были экспрессированы в различных организмах, таких как дрожжи или растения.

Обзор посвящен современным данным о природных и рекомбинантных фитазах микроорганизмов.

Фитазы бактерий. Ферменты с фитазной активностью были обнаружены у представителей родов *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Treponema* sp., у видов *Klebsiella terrigena*, *Escherichia coli*.

У *E. coli* идентифицирован ген *appA2*, кодирующий белок с фосфатазной/фитазной активностью с оптимумом pH 2.5 и гомологичный на 95% гену КФ AppA *E. coli* (отличие между белками составляет 7 аминокислот) [21]. Ген *appA2* был клонирован в клетках *Streptomyces lividans*, которые синтезировали и секретировали негликозилированный белок с молекулярной массой 45 кДа [24]. Кроме того, ген *appA2* был экспрессирован в клетках дрожжей *Pichia pastoris*, *S. cerevisiae* и *S. pombe*. Все три вида дрожжей синтезировали экстраклеточную рекомбинантную фитазу с молекулярной массой в пределах 51.5–56 кДа, оптимумами pH 3.5 и температуры 55 °С. Увеличение молекулярной массы было обусловлено различной степенью гликозилирования рекомбинантного белка. При этом наиболее высокий уровень продукции был достигнут у метилотрофных дрожжей *P. pastoris* (272 Ед/мл среды), тогда как уровень продукции этого белка у *S. pombe* составил всего 2.8 Ед/мл среды [14].

Ген *appA2* фитазы *E. coli* использовали для получения трансгенных мышей. Ген экспрессировали в клетках слюнных желез мышей, в результате чего в слюне был обнаружен биологически активный гликозилированный фермент (55 кДа), что привело к значительному уменьшению экскреции фосфора в среду. Этот удачный эксперимент является одним из путей решения проблем фосфатных кормовых добавок и предотвращения фосфорного загрязнения среды при разведении сельскохозяйственных животных [8].

Таким образом, в настоящее время наиболее изученной бактериальной фитазой является *appA2 E.coli*, но этот фермент не производится в промышленных масштабах.

Фитазы грибов. Фитатдеградирующие ферменты обнаружены у различных видов мицелиальных грибов, таких как *Aspergillus* sp., *Emericella nidulans*, *Myceliophthora thermophila*, *Talaromyces thermophilus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizopus oligosporus*, *Myceliophthora thermophila*, *Talaromyces thermophilus*, а также у некоторых видов дрожжей. Фитазы *Aspergillus* sp. и *Peniophora* sp. производятся в коммерческих масштабах для использования в качестве кормовых добавок [11].

Все исследованные фитазы мицелиальных грибов являются мономерными белками с различной степенью гликозилирования [31].

Фитазы *Aspergillus* sp. Фитазы синтезируют различные представители *Aspergillus* sp.: *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. ficuum*, *A. fumigatus*, *A. terreus*.

У *A. niger* обнаружено два типа фитаз – PhyA и PhyB. Синтез обеих фитаз в штамме дикого типа *A. niger* NRRL 3135 подавляется повышением концентрации фосфата [29].

Сегодня главным источником и продуцентом фитазы является вид *A. niger*, а именно штамм дикого типа *A. niger* NRRL 3135, из которого был выделен ген *phyA*, кодирующий кислую фосфатазу с фитатдеградирующей активностью. Однако собственная продукция фитазы А была недостаточной, поэтому ген *phyA* был клонирован под контролем промотора гена глюкоамилазы *A. niger* и экспрессирован в клетках штамма *A. niger* NRRL 3135. Это позволило обойти репрессию фосфатом и повысить уровень продукции фитазы в 52 раза по сравнению с уровнем продукции у штамма дикого типа, что составило 7.9 г белка на 1 л среды [29].

Фитаза А (PhyA) представляет собой секретируемый мономерный гликопротеин с молекулярной массой приблизительно 85 кДа, который, как предполагают авторы, имеет два оптимума рН реакции (2.5 и 5.0) и температурный оптимум при 58 °С. Белок имеет 10 потенциальных сайтов N-гликозилирования. Степень гликозилирования белка зависит от системы экспрессии. Однако после дегликозилирования рекомбинантная фитаза сохраняет 95% своей исходной активности, следовательно, гликозилирование не влияет на активность фитазы [32].

Фитаза В (PhyB) является тетрамером. Фермент способен гидролизовать фитаты только при значении рН 2.0–2.5, а при рН 5.0 активность фитазы В отсутствует в отличие от фитазы А. По сравнению с PhyA фитаза В более устойчива к повышению температуры [26].

Несмотря на то, что фитаза А аспергилла обладает высоким сродством к фитиновой кислоте, ее низкий выход, а также узкие пределы термостабильности и высокая стоимость фермента делают этот организм не самым подходящим источником фитазы для изготовления кормовых добавок для животных. Поэтому в данное время актуальным является поиск других микроорганизмов-продуцентов фитазы.

К настоящему моменту проведены эксперименты по экспрессии гена *phyA* в семенах табака и листьях сои, а также в клетках *E. coli*, дрожжей *S. cerevisiae* и *P. pastoris*. Получены штаммы метилотрофных дрожжей *P. pastoris* с высоким уровнем продукции фитазы PhyA аспергилла. Оптимизированная последовательность гена *phyA* *A. niger* была экспрессирована под контролем промотора алкогольоксидазы АOX1 *P. pastoris*. Наличие лидерной последовательности α -фактора дрожжей *S. cerevisiae* обеспечивало секрецию рекомбинантного белка [32]. Выход очищенной фитазы с активностью 865 Ед/мл составлял 6.1 г на 1 л культуры, что в 14.5 раз больше, чем при экспрессии в клетках *P. pastoris* гена *phyA* дикого типа. Молекулярная масса рекомбинантной фитазы варьировала от 64 до 120 кДа, что объясняется разной степенью гликозилирования молекул. Физико-химические свойства рекомбинантного фермента не отличались от свойств PhyA *A. niger*.

Аналогичные работы были проведены с фитазой *A. fumigatus*. Ген фитазы *A. fumigatus* был экспрессирован в системе *P. pastoris*. При этом дрожжи секретировали 729 мг белка на 1 л культуры. Рекомбинантная фитаза обладала оптимумами рН и температуры, молекулярной массой, степенью гликозилирования и специфичностью к фитату натрия и паранитрофенилфосфату, сходными по значению с таковыми у фитазы *A. niger*. При этом рекомбинантная фитаза является очень термостабильной: при нагревании до 90 °С в течение 20 мин фермент сохранял свыше 39% остаточной активности [22].

В 2002 г. группой японских ученых в ходе исследования процессов брожения рисового суслу при изготовлении сакэ, в котором участвуют два вида грибов – дрожжи *S. cerevisiae* и плесневый гриб *A. Oryzae* – были идентифицированы три кислых фосфатазы, продуцируемые *A. oryzae*. Эти ферменты были обозначены как АСР-I, АСР-II, АСР-III. Впоследствии было показано, что только фосфатаза АСР-II обладает фитазной активностью. Новая фитаза АСР-II была подробно изучена, в частности, стало известно, что она имеет молекулярную массу 58 кДа, оптимум рН 5.0, температурный оптимум при 40 °С. На основе результатов исследования было выдвинуто предположение о кооперации всех трех ферментов-фосфатаз для гидролиза фитиновых кислот и высвобождения фосфата в клетках гриба *A. oryzae*. Сначала фитаза АСР-II отщепляет одну молекулу фосфата от фитиновой кислоты, затем остальные фосфатные группы, связанные с инозитолом, отщепляются преимущественно с участием фосфатаз АСР-I и АСР-III [7].

Во время брожения рисового суслу клетки *A. oryzae* синтезируют ряд ферментов, в том числе кислые фосфатазы и фитазу, которые расщепляют фитиновые кислоты, в избытке присутствующие в рисе, и таким способом снабжают дрожжи фосфатом в

концентрациях, необходимых для их роста и спиртового брожения (0.5–1.0 мМ)). Возможность подобной совместной работы кислой фосфатазы и фитазы при деградации фитатов была показана и ранее при изучении процессов прорастания семян кукурузы [13].

Вместе с тем в разное время проводились работы с геном *phyA* по созданию трансгенных организмов, способных синтезировать фитазу. Это, в первую очередь, трансгенные сельскохозяйственные растения, которые содержат молекулы фитазы и могут увеличить доступность фитинового фосфора в процессе пищеварения. Такое использование растений в качестве «биореакторов» является альтернативным способом коммерческого производства фитазы.

В 1993 г. ген *phyA* был введен в клетки семян табака, где он экспрессировался под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV) и сигнального пептида белка PR-S табака, в результате чего происходила упаковка молекул фермента в стабильные частицы, которые могли быть включены в состав корма для животных [20]. В 1995 г. в результате экспрессии гена *phyA* в клетках листа табака *Nicotiana tabacum* была получена биологически активная фитаза в количестве до 14.4% от всего растворимого белка растительных клеток [28]. В 1997 г. ген *phyA* был экспрессирован в клетках соевых бобов, и было показано, что биохимические характеристики рекомбинантного и природного ферментов не различаются [15]. В 2003 г. ген *phyA* был клонирован в клетках листа картофеля. Синтезированный белок был стабилен и каталитически активен [25].

Фитаза аспергилла используется в кормах для животных, однако использование этих ферментов в питании человека проблематично. Альтернативой является применение дрожжей-сахаромицетов.

Длительный опыт применения дрожжей *S. cerevisiae* для производства хлеба и напитков свидетельствует о том, что они не являются патогенными для человека. Дрожжи в качестве продуцентов фитаз позволяют не только получить рекомбинантный белок, но и использовать штаммы-продуценты в качестве пищевой добавки.

Дрожжи являются прекрасным источником белков и витаминов. Белки, синтезируемые дрожжами, усваиваются легче, чем белки животного происхождения, а также повышают биологическую ценность других кормов. Фосфор и кальций, находящиеся в составе дрожжей, способствуют нормальному развитию костной ткани, а витамины группы В, содержащиеся в дрожжевых клетках, являются регуляторами метаболизма жиров. Кроме того, было показано, что липополисахариды, входящие в состав клеточной стенки микроорганизмов, активируют систему местного иммунитета и, взаимодействуя с факторами регуляции интерферонов, индуцируют продукцию собственных цитокинов [6, 20]. Клетки дрожжей могут выполнять функцию транспортного средства для доставки нужного белка и способны обеспечивать синтез рекомбинантных белков в организме человека и животных [3, 5, 10].

Фитазы дрожжей. Характеристика фитаз дрожжей. Ферменты, способные гидролизовать фитиновые кислоты, были обнаружены у разных представителей дрожжевых грибов. Было проверено большинство известных видов дрожжей, из которых тридцать пять обладали заметной фитазной активностью [17]. К ним относятся *Schwanniomyces castellii*, *Arxula adenivorans*, *Candida* sp., *Hansenula polymorpha*, *Pichia* sp., *Kluyveromyces lactis*, *S. cerevisiae* и др. Дрожжи *Pichia rhodanensis* и *Pichia spartinae* продемонстрировали, кроме того, очень высокий уровень секреции фитазы.

Активный поиск дрожжевых фитаз начался в 1992 г., когда были выделены секреторные фитазы *S. castellii* и *S. occidentalis* [17, 23]. Обнаруженные фитазы работают в области рН 4.5 и при 60–75 °С. Однако встречаются более термостабильные фитазы, например, фитаза *P. spartinae*, которая сохраняет активность при 80 °С. Следует отметить,

что температурная устойчивость фитаз зависит от наличия субстрата. В отсутствие фитата ферменты при такой температуре инактивируются в течение 30 мин. У некоторых штаммов, по-видимому, существует еще одна фитаза, которая работает при 37 °С и при pH 3–4 [17].

У некоторых фитаз дрожжей изучена четвертичная структура. Фермент *S. castellii* и *S. occidentalis* представляет собой тетрамер с молекулярной массой 420 кДа, состоящий из одной большой субъединицы (125 кДа) и трех малых субъединиц (70 кДа) [17, 23].

Фитазная активность дрожжей *S. cerevisiae*. Пекарские дрожжи *S. cerevisiae* активно используются в биотехнологии для синтеза рекомбинантных белков. Кроме того, они имеют статус GRAS (generally recognized as safe) по определению организации «US. Food and Drug Administration», т. е. безопасны для человека. Было показано, что все проверенные штаммы дрожжей способны усваивать фитат, когда он является единственным источником фосфора в среде [4], это свидетельствует о том, что дрожжи-сахаромицеты содержат ферменты, обладающие фитазной активностью, и могут быть использованы для получения фитазы. Однако естественная активность фитаз у дрожжей слишком низка для того, чтобы в процессе брожения, например, при приготовлении хлеба, обеспечить расщепление фитатов и влиять на биодоступность железа. Поэтому особую ценность могли бы иметь штаммы дрожжей, обладающие повышенной активностью фитазы. В отличие от аспергилла, структурные гены фитаз дрожжей не идентифицированы, а данные, касающиеся их регуляции и синтеза противоречивы.

Т. А. Андлид и соавторы показали, что активность фитазы у дрожжей зависит от концентрации неорганического фосфата. Высокое содержание фосфора в среде полностью блокирует гидролиз фитата [4]. Таким образом, активность фитаз регулируется координированно с кислой фосфатазой (КФ2) дрожжей, кодируемой геном *PHO5* [19]. В настоящее время проведено сравнительное изучение кислых фосфатаз дрожжей Петергофской генетической коллекции (ПГЛ), Американской генетической коллекции (АГК) и линий дрожжей, используемых при изготовлении саке. Показано, что в процессе роста дрожжи секретируют в среду три изозима КФ. Добавление фосфора в среду ингибирует синтез двух фосфатаз – КФ2 и КФ3 (продуктов генов *PHO5* и *PHO11* соответственно), тогда как уровень КФ1 (продукта гена *PHO3*) не изменяется (рис. 2). В то же время уровень КФ1 зависит от присутствия тиамин в культуральной среде. При дефиците фосфата основным изозимом является КФ2 [1, 2]. Все три изозима отличаются по молекулярной массе и физико-химическим свойствам (таблица).

В ходе исследований «дрожжевой фитазы» было показано, что деградация фитата происходила как в синтетической, так и в полной среде без фосфата в широком интервале

Характеристика кислых фосфатаз дрожжей *S. cerevisiae* ПГЛ и АГК

Ген	Белок	Активность в присутствии Фн	Мол. масса белка, кДа *	pH оптимум	Остаточная активность (15 мин при 40°), %	Км для п-НФФ, мкМ	Литература
<i>PHO3</i>	КФ1	есть	57	3.7	100	2.0	[1]
<i>PHO5</i>	КФ2	нет	60	4.6	40	0.9	
<i>PHO11</i>	КФ3	нет	55	4.6	инактивация	1.8	[2]

Примечание. * – молекулярная масса дегликозилированного белка; Км – константа Михаэлиса–Мэнтэн.

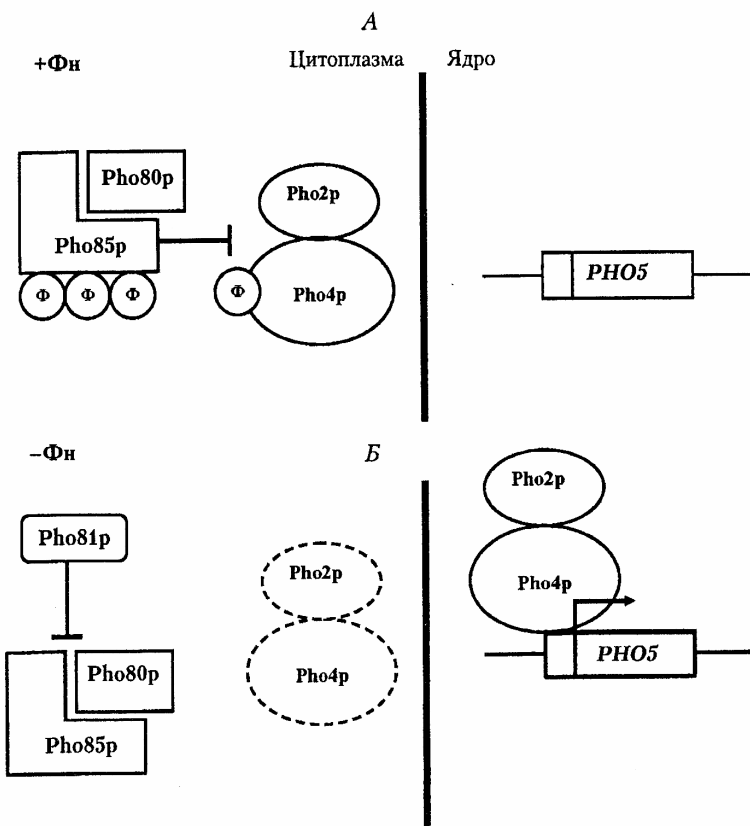


Рис. 2. Регуляция экспрессии гена *PHO5*, кодирующего КФ2, в зависимости от концентрации внутриклеточных фосфатов.

А – при высокой концентрации фосфата в клетке комплекс циклина Pho80p и циклин-зависимой протеинкиназы Pho85p фосфорилирует и ингибирует активатор Pho4p с коактиватором Pho2p; Б – при снижении количества фосфата и инактивации циклин-киназного комплекса с помощью ингибитора Pho81p запускают транскрипцию гена *PHO5*. Ф – фосфаты.

pH 4.5–6.0 [4]. Добавление Фн в синтетическую среду приводило к сильной репрессии фитазной активности при этих значениях pH. В то же время добавление неорганического фосфата к полной среде сопровождалось лишь незначительным снижением активности фитазы при pH 6.0. На основании этих данных авторы предположили, что функцию фитазы может играть КФ2, кодируемой геном *PHO5*.

Однако этому предположению противоречат следующие данные:

- 1) активность КФ2 дрожжей ПГЛ и АТК отсутствует на синтетической среде;
- 2) активность КФ2 на полной среде при pH 6.0 составляет не более 15–20% от ее активности при pH 4.6;
- 3) КФ2 и КФ3 являются термолабильными белками.

Об этом же свидетельствуют данные Андлида и соавторов: у штаммов с делецией гена *PHO5* не была нарушена способность к деградации фитата как в полной, так и в синтетической среде. Авторы [4] оценивали влияние повышенной экспрессии гена *PHO5* на деградацию внеклеточного фитата. Было показано, что сверхпродукция КФ2 приводит

к повышению деградации фитата. Эти результаты могут быть объяснены тем, что кислые фосфатазы являются неспецифическими ферментами с широким спектром субстратов и поэтому могут расщеплять фитат. В пользу такого предположения свидетельствуют данные о том, что экспрессия гена *PHO3 S. cerevisiae* в клетках *A. oryzae* [26], также сопровождалось повышением фитазной активности.

Для того чтобы выяснить, может ли КФ1 являться фитазой дрожжей, авторы использовали синтетическую среду без тиамин, на которой уровень экспрессии *PHO3* должен увеличиваться. Однако оказалось, что уровень тиамин не влияет ни на деградацию фитата, ни на скорость роста дрожжей. Следует отметить, что предположение о том, что КФ1 является фитазой дрожжей маловероятно еще и потому, что оптимум рН этого фермента находится при рН 3.7, а при рН 6.0 активность фермента у дрожжей разных генетических линий составляет от 10 до 25%.

Дальнейшие исследования авторов показали, что в регуляцию активности фитаз дрожжей вовлечены позитивные и негативные регуляторы *PHO*-системы – *Pho2p*, *Pho4p*, *Pho85p*, *Pho80p*. Это свидетельствует о том, что структурный ген фитазы является частью *PHO*–регулона дрожжей [27].

Таким образом, сравнительный анализ данных лаборатории биохимической генетики БиНИИ СПбГУ и данных Андлида и соавторов позволяет сделать вывод о том, что у дрожжей есть ферменты, обладающие фитазной активностью, которые на генетическом уровне регулируются белками *PHO*-системы, но не являются ни одним из трех изоформ кислой фосфатазы: ни КФ1, ни КФ2, ни КФ3. Следовательно, у дрожжей может быть фермент фитаза, структурный ген которой до сих пор не идентифицирован.

В заключение можно сказать, что особенности биологии и метаболизма дрожжей-сахаромицетов являются возможной причиной отсутствия специфических фитаз. Фитазы с высокой специфической активностью присутствуют у тех видов микроорганизмов, которые являются естественными редуцентами растительных остатков, например, *A. adeninivorans* [12]. У других видов дрожжей, как правило, присутствуют фосфатазы с широким спектром субстратов, в числе которых может находиться и фитат [30].

Тем не менее, дрожжи, как излюбленный объект биотехнологии, могут быть использованы для производства фитаз различного происхождения, а исследования направлены как на поиск собственной фитазы и повышение ее специфической активности и продукции, так и на клонирование в дрожжах гетерологичных генов фитаз.

Summary

Savinov V. A., Sambuk E. V., Padkina M. V. Natural and recombinant phytases of microorganisms.

Phytases are a special subclass of acid phosphatases, which catalyze the hydrolysis of phosphate moieties from phytic acid (*myo*-inositol hexakisphosphate), the primary storage form of phosphorus in plants. However, phytases are lacking in gastrointestinal tract of human and farming animals what prevents them from effective assimilation of phosphorus from a plant food and reduces bioavailability of essential minerals. The present review is focused on the contemporary data of natural phytases of microorganisms, the principal enzyme source for industrial producing, and also on experimental results in creating recombinant phytase.

Литература

1. Краснопевцева Н. Г., Уразманова Н. А., Падкина М. В., Смирнов М. Н. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей. XII. Выделение и характеристика репрессибельных кислых фосфатаз у дрожжей // Вестн. Ленингр. ун-та. Сер. 3. 1986. Вып. 3. С. 98–106. 2. Падкина М. В., Краснопевцева Н. Г., Петрашень М. Г., Кожин С. А., Смирнов М. Н. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (сообщение I. Характеристика

кислых фосфатаз разных штаммов) // Генетика. 1974. Т. X. № 11. С. 100–110. 3. *Agarwal N., Kamra D. N., Chaudhary L. C., Sahoo A., Pathak N. N.* Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for use as a microbial feed additive // *Lett. Appl. Microbiol.* 2000. Vol. 31. N 4. P. 270–273. 4. *Andlid T. A., Veide J., Sandberg A.* Metabolism of extracellular inositol hexaphosphate (phytate) by *Saccharomyces cerevisiae* // *Int. J. Food Microb.* 2004. Vol. 97. P. 157–169. 5. *Blanquet S., Antonelli R., Laforet L., Denis S., Marol-Bonnin S., Alric M.* Living recombinant *Saccharomyces cerevisiae* secreting proteins or peptides as a new drug delivery system in the gut // *J. Biotechnol.* 2004. Vol. 110. N 1. P. 37–49. 6. *Coates N. J., McColl S. R.* Production of chemokines in vivo in response to microbial stimulation // *J. Immunol.* 2001. Vol. 166. N 8. P. 5176–5182. 7. *Fujita J., Yamane Y.-I., Fukuda H.* Production and properties of phytase and acid phosphatase from a sake koji mold, *Aspergillus oryzae* // *J. Biosci. and Bioeng.* 2003. Vol. 95. N 4. P. 348–353. 8. *Golovan S., Hayes M. A., Phillips J. P., Forsberg C. W.* Transgenic mice expressing bacterial phytase as a model for phosphorus pollution control // *Nat. Struct. Biol.* 2001. Vol. 19. P. 429–433. 9. *Haefner S., Knietzsch A., Scholten E., Braun J., Lohscheidt M., Zelder O.* Biotechnological production and applications of phytases // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. Vol. 68. P. 588–597. 10. *Haraldsson A., Veide J., Andlid T.* Degradation of phytate by high-phytase *Saccharomyces cerevisiae* strains during simulated gastrointestinal digestion // *J. Agric. Food Chem.* 2005. Vol. 53. P. 5438–5444. 11. *Igbasan F. A., Manner K., Miksch G., Borriss R., Farouk A., Simon O.* Comparative studies on the in vitro properties of phytases from various microbial origins // *Arch. Tierernahr.* 2000. Vol. 53. N 4. P. 353–373. 12. *Kaur P., Lingner A., Singh B., Boer E., Polajeva J., Steinborn G.* APHO1 from the yeast *Arxula adenivorans* encodes an acid phosphatase of broad substrate specificity // *Antonie van Leeuwenhoek* (<http://www.springerlink.com>). 2006. Vol. 91. N 1. 13. *Laboure A. M., Cagnon J., Lescure A. M.* Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination // *Biochem. J.* 1993. N 295. P. 413–419. 14. *Lee S., Kim T., Stahl C. H., Lei X. G.* Expression of *Escherichia coli* AppA2 phytase in four yeast systems // *Biotechnol. Lett.* 2005. Vol. 27. N 5. P. 327–334. 15. *Li J., Hegeman C. E., Hanlon R. W., Lacy G. H., Denbow D. M., Graban E. A.* Secretion of active recombinant phytase from soybean cell-suspension cultures // *Plant Physiol.* 1997. Vol. 114. P. 1–9. 16. *Mullaney E. J., Ullah A. H.* The term phytase comprises several different classes of enzymes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. Vol. 312. N 1. P. 179–184. 17. *Nakamura Y., Fukuhara H., Sano K.* Secreted phytase activities of yeasts // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000. Vol. 64. P. 841–844. 18. *Navarro L., David M.* p38-dependent activation of interferon regulatory factor 3 by lipopolysaccharide // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. N 50. P. 35535–35538. 19. *Oshima Y.* The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes Genet. Syst.* 1997. Vol. 72. P. 323–334. 20. *Pen J., Verwoerd T. C., Hoekema A.* Phytase containing transgenic seeds as a model feed additive for improved phosphorus utilization // *Biotechnol.* 1993. Vol. 11. P. 811–814. 21. *Rodriguez E., Han Y., Lei X. G.* Cloning, sequencing, and expression of an *Escherichia coli* acid phosphatase/phytase gene (appA2) isolated from pig colon // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. Vol. 257. N 1. P. 117–123. 22. *Rodriguez E., Mullaney E. J., Lei X. G.* Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. Vol. 268. N 2. P. 373–378. 23. *Segueilha L., Lambrechts C., Boze H.* Purification and properties of phytase from *Schwanniomyces castellii* // *J. Ferment. Bioeng.* 1992. Vol. 74. P. 7–11. 24. *Stahl C. H., Wilson D. B., Lei X. G.* Comparison of extracellular *Escherichia coli* AppA phytases expressed in *Streptomyces lividans* and *Pichia pastoris* // *Biotechnol. Lett.* 2003. Vol. 25. N 10. P. 827–831. 25. *Ullah A. H., Sethumadhavan K., Mullaney E. J., Ziegelhoffer T., Austin-Phillips S.* Fungal phyA gene expressed in potato leaves produces active and stable phytase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. Vol. 306. N 2. P. 603–609. 26. *Vats P., Banerjee U. C.* Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview // *Enz. and Microb. Tech.* 2004. Vol. 35. P. 3–14. 27. *Veide J., Andlid T.* Improved extracellular phytase activity in *Saccharomyces cerevisiae* by modifications in the PHO system // *Int. J. Food Microb.* 2006. P. 1–8. 28. *Verwoerd T. C., van Paridon P. A., van Ooyen A. J. J., van Lent J. W. M., Hoekema A., Pen J.* Stable accumulation of *Aspergillus niger* phytase in transgenic tobacco leaves // *Plant Physiol.* 1995. Vol. 109. P. 1199–1205. 29. *Wodzinski R. J., Ullah A. H.* Phytase // *Adv. Appl. Microbiol.* 1996. N 42. P. 263–302. 30. *Wyss M., Brugger R., Kronenberger A., Remy R., Fimbel R., Oesterhelt G., Lehmann M., van Loon A.* Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases):

catalytic properties // *Appl. and Env. Microbiol.* 1999. Vol. 65. N 2. P. 367–373. **31.** *Wyss M., Pasamontes L., Friedlein A., Remy R., Tessier M., Kronenberger A., van Loon A.* Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance // *Appl. and Env. Microbiol.* 1999. Vol. 65. N 2. P. 359–366. **32.** *Xiong A. S., Yao Q. H., Peng R. H.* High level expression of a recombinant acid phytase gene in *Pichia pastoris* // *J. Appl. Microbiol.* 2005. Vol. 98. N 2. P. 418–428. **33.** *Yang J. W., Schweingruber M. E.* The structural gene coding for thiamin-repressible acid phosphatase in *Schizosaccharomyces pombe* // *Curr. Genet.* 1990. N 18. P. 269–272.

Статья принята к печати 18 декабря 2006 г.