

На правах рукописи



Бытяк Денис Сергеевич

**РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ
ФОСФОЛИПАЗЫ A2 KOMAGATAELLA PHAFFII**

2.7.1 Биотехнологии пищевых продуктов, лекарственных и биологически
активных веществ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Воронеж – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий».

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор
Корнеева Ольга Сергеевна.

Официальные оппоненты – **Синицын Аркадий Пантелеймонович**
доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет имени
М. В. Ломоносова», заведующий лабораторией
биотехнологии ферментов химического
факультета;
Гордеева Татьяна Леонидовна
кандидат биологических наук, ФГБОУ
"Национальный исследовательский центр
«Курчатовский институт», ведущий научный
сотрудник.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский биотехнологический университет»

Защита состоится «05» сентября 2024 г. в 11 ч 30 мин. на заседании совета Д24.2.287.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий» по адресу: 394036, Воронеж, пр-т Революции, д. 19, конференц-зал.

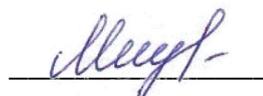
Отзывы на автореферат, заверенные гербовой печатью учреждения, просим присылать ученому секретарю совета Д 24.2.287.02.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «ВГУИТ». Полный текст диссертации размещен в сети «Интернет» на официальном сайте ФГБОУ ВО «ВГУИТ» www.vsu.ru.

Автореферат размещен в сети Интернет на интернет-сайте ВАК Министерства науки и высшего образования РФ: vak.minobrnauki.gov.ru и на официальном сайте ФГБОУ ВО «ВГУИТ» www.vsu.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат технических наук



О. Л. Мещерякова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В настоящее время актуальной задачей биотехнологии является создание микроорганизмов-продуцентов ферментов нового поколения с целью их применения в пищевых технологиях. Важную роль в пищевой промышленности играет фосфолипаза А2 (PLA2), которая применяется в производстве пищевых масел, комбинированных сычужных сыров, сырных продуктов, хлебобулочных изделий, эмульгаторов, в том числе при производстве энзиматически-модифицированного яичного желтка в составе майонезе.

Согласно статистическим данным, 68,3 % фосфолипаз получены путем микробного синтеза. Ёмкость мирового рынка фосфолипазы А2 в стоимостном выражении составляла 224 млрд \$ в 2021-м году, и к 2032 г. ожидается совокупный годовой темп роста фермента на уровне 6,15 %.

Фосфолипаза А2 широко используется на пищевых предприятиях Российской Федерации. Однако на сегодняшний день в России отсутствует промышленное производство данного фермента, в связи с чем актуальным является разработка технологии получения отечественного ферментного препарата высокоактивной фосфолипазы А2, в том числе в рамках повышения продовольственной безопасности страны и развития потенциала импортозамещения ферментативной продукции.

Для обеспечения высокого уровня биосинтеза нового поколения фосфолипаз широко используются рекомбинантные штаммы с наиболее высоким уровнем экспрессии целевых ферментов

Степень разработанности темы. Значительный вклад в исследования в области микробного синтеза рекомбинантных белков, в том числе обладающих ферментативной активностью, с помощью *Komagataella*, внесли ведущие отечественные и зарубежные ученые: Падкина М. В., Самбук Е. В., Синеокий С. П., Гордеева Т. Л., Тюрин О. В., Сеницын А. П., Козлов Д. Г., Rachel Daly, G Gellissen, Cletus Paul Kurtzman, James M. Cregg, Kevin J. Barringer.

Однако, несмотря на достаточно большое количество исследований и экспериментальных данных, на сегодняшний день не существует технологии получения секреторной фосфолипазы А2 посредством рекомбинантного генно-инженерного штамма *Komagataella phaffii*, что требует углубления и расширения научных данных, направленных на практическую реализацию.

Цель работы: Разработка технологии получения отечественной фосфолипазы А2 с применением генно-инженерно-модифицированного штамма *Komagataella phaffii*.

Задачи научного исследования:

1. Получить ауксотрофный штамм *Komagataella phaffii* YIB- Δ leu2 на основе штамма-реципиента *Komagataella phaffii* Y-3489.
2. Создать новый генно-инженерно-модифицированный штамм-продуцент рекомбинантного белка PLA2 на основе ауксотрофного штамма *Komagataella phaffii* YIB- Δ leu2.
3. Оптимизировать состав питательной среды и условия культивирования генно-инженерно-модифицированного штамма-продуцента фосфолипазы A2.
4. Исследовать индукцию AOX1-промотора и экспрессию рекомбинантного белка PLA2.
5. Получить ферментный препарат на основе штамма-продуцента, обладающий фосфолиполитической активностью.
6. Исследовать физико-химические характеристики ферментного препарата.
7. Нарботать экспериментальную партию пищевой продукции с использованием ферментного препарата фосфолипаза A2.

Научная новизна работы. Впервые получен новый штамм дрожжей *Komagataella phaffii* YIB Δ leu2, ауксотрофный по лейцину (депонирован в ВКПМ Y-4761), представляющий значительный интерес для промышленной биотехнологии и доказана возможность его использования в качестве штамма-реципиента при сборке коммерческого штамма-продуцента фосфолипазы A2.

Впервые разработан и охарактеризован штамм *Komagataella phaffii* YIB Δ ley2_PLA2Sv v (депонирован в ВКПМ Y-4513), обеспечивающий синтез рекомбинантной фосфолипазы A2 в культуральную жидкость.

Установлено, что использование *Komagataella phaffii* YIB Δ ley2_PLA2Sv обеспечивает получение ферментного препарата «Фосфолипаза A2» обладающего ферментативной активностью, сопоставимой с коммерческими аналогами.

Определены оптимальные параметры культивирования *Komagataella phaffii* YIB Δ ley2_PLA2Sv, в том числе установлено, что при температуре в диапазоне от 28,2 °C до 31,0 °C и pH от 6,1 до 6,3 концентрация биомассы в колбах достигает более 87 г/л. Показано, что содержание метанола в среде от 0,6 % до 2,0 % способствует индукции AOX1 промотора и синтезу рекомбинантного белка «Фосфолипаза A2» в культуральную жидкость не менее 1,87 г/л.

Показано, что применение керамических фильтрационных модулей Tamі, селективностью 10 кДа, обеспечивает концентрирование и получение ферментного препарата с активностью 17 979 ед/мл.

Исследованы физико-химические характеристики полученного ферментного препарата, в том числе показано, что при значениях pH 8,5 и температуре 50 °C фосфолипаза A2 обладает наибольшей ферментативной активностью. Также установлено, что полное подавление активности фермента достигается при 67,4 °C и времени экспозиции 56 минут. Показано, что через 12 месяцев хранения ферментного препарата, активность составила более 10 500 ед/мл, что соответствует снижению активности не более чем на 12,52 %.

Теоретическая и практическая значимость. Получены новые и расширены существующие знания о экспрессии рекомбинантных белков, при культивировании *Komagataella phaffii*. Результаты исследований могут быть использованы для более глубокого понимания экспрессии фосфолипазы A2, в составе плазмиды pSEA-LEU-PLA2Sv под контролем промотора гена AOX1, содержащего области, обеспечивающие активацию транскрипции в присутствии метанола в культуральной среде.

Разработанная в ходе выполнения работы методика определения ферментативной активности фосфолипазы A2 позволяет более глубоко исследовать ферментативный катализ.

Практическая значимость исследования заключается в создании генетической конструкции в виде рекомбинантного вектора pSEA-LEU-PLA2Sv и штамма *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) YIB Δ leu2_PLA2Sv, обеспечивающих индуцируемый синтез с высоким и стабильным выходом рекомбинантной фосфолипазы A2. Разработана технология, обеспечивающая получение ферментного препарата фосфолипаза A2, которая может быть интегрирована в промышленное производство. Новизна технических решений подтверждена патентами РФ: RU2746817C1 «Способ получения штамма-продуцента фосфолипазы A2 *Komagataella phaffii* YIB Δ leu2_PLA2Sv» и RU2676321C1 «Способ получения ферментного препарата фосфолипазы A2 с применением рекомбинантного штамма-продуцента *Pichia pastoris* X-33/ pPICZ α A-PhoA2-StV». Разработанный ферментный препарат по своим физико-химическим и потребительским характеристикам не уступает зарубежным аналогам.

Показана возможность применения полученного ферментного препарата в процессе производства ферментированного яичного желтка, применяемого при производстве майонезной продукции.

Методология и методы исследования. Для выполнения диссертационного исследования применялись общенаучные и специальные методы исследования, в том числе: физико-химические, гравиметрические, спектрофотометрические, генно-инженерные, микробиологические и математические. В диссертационной работе применялось математическое моделирование, с учетом культурально-морфологических характеристиках исследуемого штамма-продуцента. Эксперименты проводились в трех повторностях; погрешность измерений опытов не превышала установленную стандартом или используемой методикой. При необходимости, в экспериментах присутствовали контрольные опыты. Проведена апробация полученных результатов в опытно-промышленных условиях.

Положения, выносимые на защиту.

1. Ауксотрофный штамм *Komagataella phaffii* YIB- Δ leu2, не способный к росту на питательной среде без лейцина.
2. Генно-инженерно-модифицированный штамм на основе ауксотрофного штамма *Komagataella phaffii* YIB- Δ leu2 продуцент высокоактивной рекомбинантной PLA2.
3. Состав питательной среды и условия культивирования генно-инженерно-модифицированного штамма-продуцента фосфолипазы A2.

4. Индукция АОХ1-промотора обеспечивает экспрессию рекомбинантного белка PLA2.
5. Ферментный препарат на основе штамма-продуцента, обладающий фосфолиполитической активностью.
6. Физико-химические характеристики полученного ферментного препарата.
7. Ферментный препарат фосфолипазы А2 обеспечивает получение майонеза с заданными реологическими свойствами.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста, содержит 55 таблиц, 42 рисунка, 14 формул и состоит из введения, аналитического обзора литературы, объектов и методов исследований, результатов исследований, заключения и списка используемой литературы, включающего 113 наименований, в том числе 110 на иностранном языке.

Личный вклад автора. Автором проведен поиск и анализ информации по исследуемой проблеме, сформулированы цель и задачи исследования, выполнен выбор объектов исследования, экспериментальных установок и методик проведения исследований. Выполнена основная часть экспериментальных исследований, направленных на разработку технологии получения фосфолипазы А2. Автором проведена опытно-промышленная апробация результатов предлагаемых технологических решений.

Публикации и апробация результатов. Основные положения диссертации опубликованы в 11 научных работах: 5 статьях в рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК Минобрнауки России, в т.ч. 2 статьи из международных баз данных Scopus и Web of Science, 2 патентах РФ, в 3 материалах международных и национальных научных конференций и 1 свидетельстве об аттестации методики измерений.

Автор выражает благодарность д.б.н., доценту Батлуцкой Ирине Витальевне; к.т.н. Кирьяновой Светлане Владимировне, коллективу ООО «ИЦ «Бирюч-НТ» за научные консультации при выполнении данной работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлены сведения о современном состоянии и тенденциях развития ранка ферментов в РФ. Проведен анализ научных источников в области микробиологического синтеза ферментных препаратов и применения фосфолипазы А2. Описаны метаболические особенности *Komagataella phaffii* и способы культивирования, с целью получения рекомбинантных белков.

Вторая глава посвящена описанию использованных в работе молекулярно-биологических, генетических, физико-химических и математических методов исследования. Описаны применяемые материалы и объекты исследования.

В последующих трех главах изложены результаты исследований и их обсуждение.

I. РАЗРАБОТКА АУКСОТРОФНОГО ШТАММА *Komagataella phaffii* $YIB-\Delta leu2$

Для обеспечения эффективного скрининга штаммов и гарантированного отсутствия генов устойчивости к антибиотикам в конечном штамме-производителе, на первом этапе получен ауксотрофный штамм *Komagataella phaffii* $YIB-\Delta leu2$. Ауксотрофный по лейцину штамм получен путем электропорации штамма *Komagataella phaffii* Y-3489 (NRRL Y-11430) линейаризованным фрагментом 5'leu2-FRT-FLP-ZeoR-FRT-3'leu2 конструкции *pMAY-LEU2* размером 9509 п.о. Карта плазмиды представлена на рисунке 1.

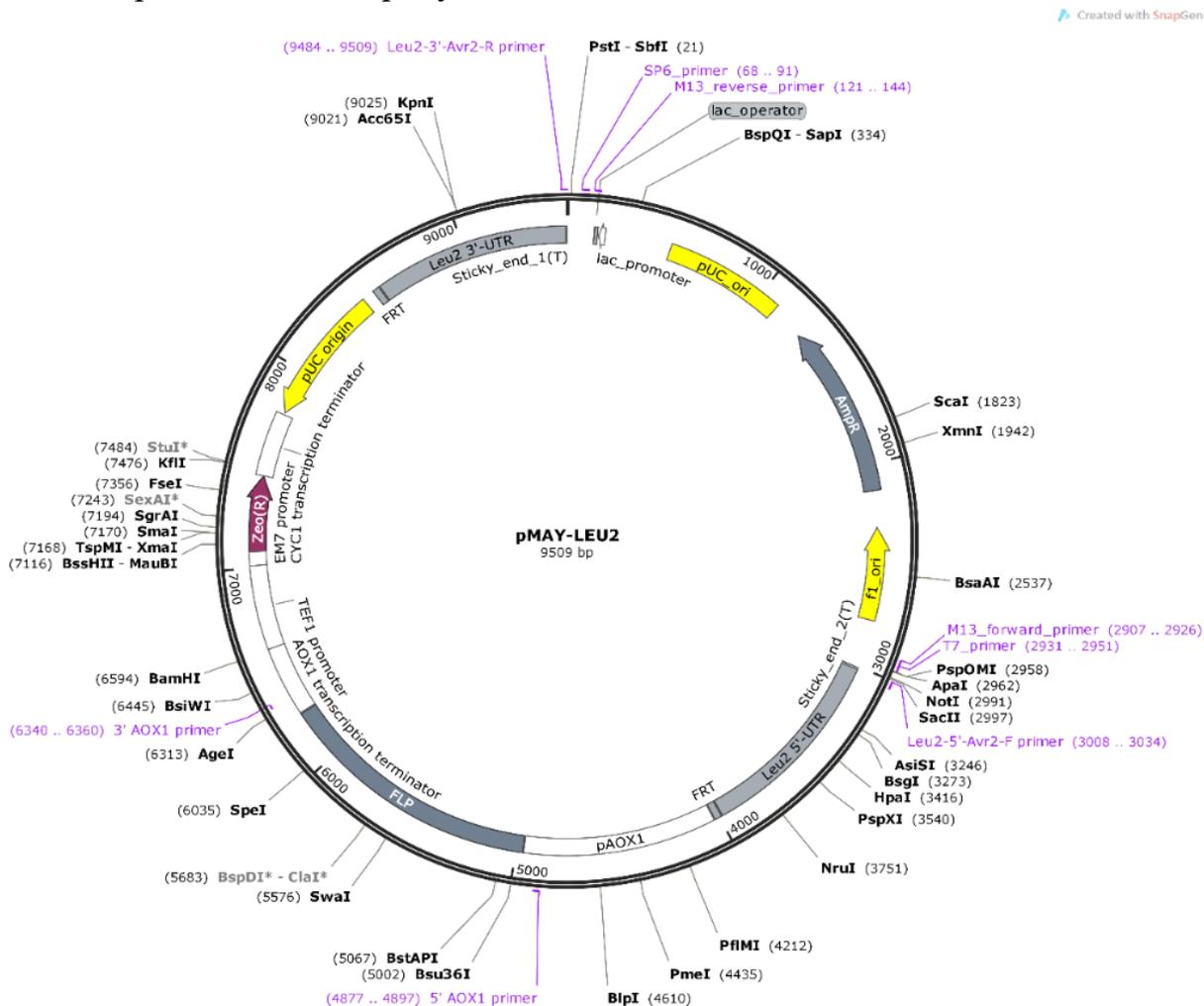


Рисунок 1. Карта плазмиды *pMAY-LEU2*

Последующее культивирование полученных трансформантов в жидкой питательной среде, содержащей метанол, индуцирующий синтез FLP-рекомбиназы, обеспечило удаление кассеты [+FLP+ZeoR] между FRT-сайтами. Таким образом получен ауксотрофный по лейцину штамм-реципиент *Komagataella phaffii* $YIB-\Delta leu2$, не содержащий генов антибиотикорезистентности. Полученный штамм депонирован в Биоресурсном Центре Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) под номером Y-4761.

II. РАЗРАБОТКА ГЕННО-ИНЖЕНЕРНО-МОДИФИЦИРОВАННОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА PLA2

Для обеспечения экспрессии PLA2 и использования восстановления прототрофности в качестве селективного фактора, на основе вектора *pPic9* (Invitrogen) получен вектор *pSEA-LEU-PhoA2Sv* размером 7834 п.о. В результате последующей линейризации по *BglII* получен фрагмент 5' *pAOX1-a-factor signal-PLA2Sv*-3' *AOX1(TT)-LEU2*-3' *AOX1(TT)*. Карта вектора представлена на рисунке 2.

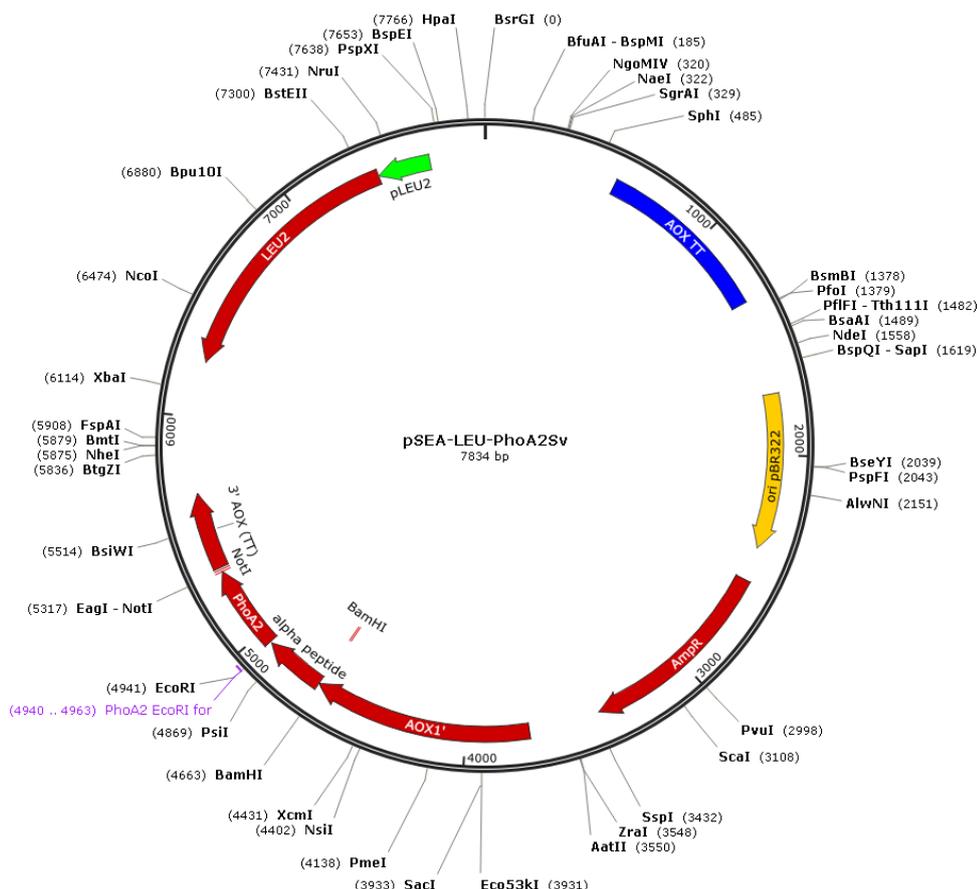


Рисунок 2. Карта вектора *pSEA-LEU-PhoA2Sv*

В результате последующей трансформации ауксотрофного штамма *Komagataella phaffii* *YIB-Δleu2*, линейризованным фрагментом конструкции *pSEA-LEU-PhoA2Sv*, получен штамм *Komagataella phaffii* *YIB Δleu2_PLA2Sv*, обеспечивающий синтез рекомбинантной фосфолипазы A2 в культуральную жидкость. Полученный штамм-продукт депонирован в Биоресурсном Центре Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) под номером Y-4513. Также получен патент РФ на изобретение RU 2 746 817 C1 «Способ получения штамма-продукта фосфолипазы A2 *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) *YIB ΔLeu2_PLA2Sv*».

В результате молекулярно-генетического исследования *Komagataella phaffii* *YIB Δleu2_PLA2Sv* на базе ФГБУ «ФНИУЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» подтверждено отсутствие в геноме последовательностей генов резистентности к антибиотикам и соответствие теоретической последовательности и локализации целевых генов.

III. ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА PLA2

Для определения оптимальных параметров культивирования штамма-производителя *Komagataella phaffii* YIB Δ ley2_PLA2Sv был построен дизайн эксперимента с помощью программного обеспечения MODDE 12.1 (MODELing and DESign) Sartorius (Германия) по следующим факторам: 1. pH, 2. Температура, 3. Количество инокулята по отношению к объему питательной среды.

На основании данных, полученных в ходе проведения серии экспериментов, построена модель поверхностного отклика (RSM), отражающая оптимальные параметры культивирования. Модель представлена на рисунке 3.

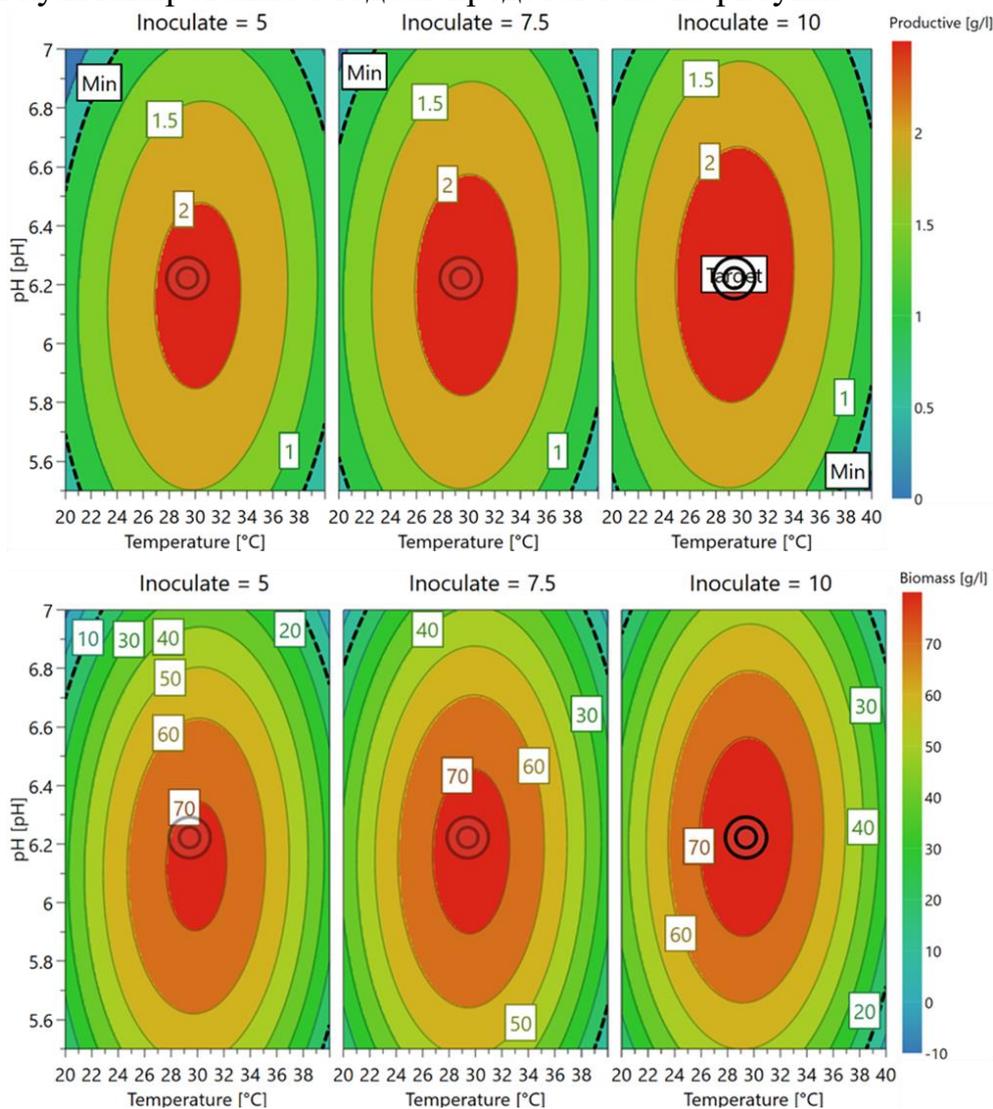


Рисунок 3. Модель определения оптимальных параметров культивирования *Komagataella phaffii* YIB- Δ ley2

Исследования показали, что внесение посевной культуры в количестве от 5% до 10 % не оказывало достоверного влияния на продуктивность штамма. Установлено, что оптимальное значение pH $6,2 \pm 0,1$, а значение температуры $30,1 \pm 0,9$ °C. Исследование ростовых характеристик проводилось при культивировании штамма-производителя *Komagataella phaffii* YIB- Δ ley2 в лабораторном ферментере Infors Minifors (Швейцария) на жидкой питательной среде BSM (Basal Salt Medium). Расчет удельной скорости роста культуры проводили по формуле 1.

$$\mu = \frac{X_1 - X_0}{X_0 * (t_1 - t_0)}$$

Где:

μ – удельная скорость роста, ч⁻¹;

X_0 – начальная концентрация биомассы, г/л;

X_1 – конечная концентрация биомассы, г/л;

t_0 – начальный момент времени, ч;

t_1 – конечный момент времени, ч.

Удельная скорость роста *Komagataella phaffii* YIB- Δ leu2 составила 0,24 ч⁻¹.
Динамика роста показана на рисунке 4.

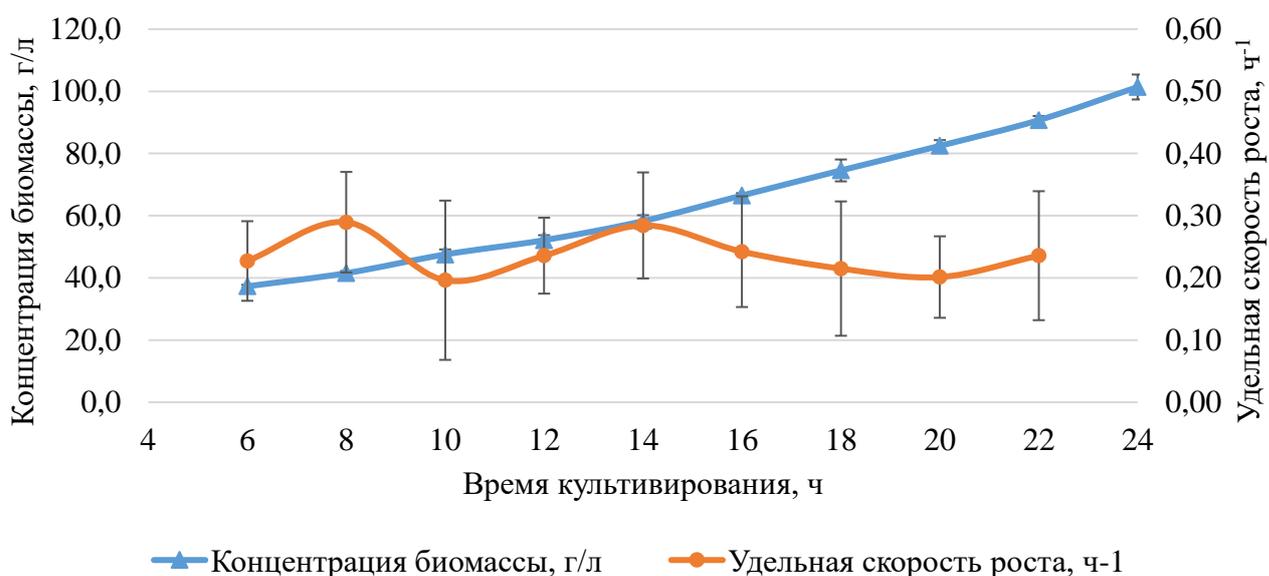


Рисунок 4. Динамика роста *Komagataella phaffii* YIB- Δ leu2

Для определения оптимального количества вносимого глицерина проведен расчет удельной скорости потребления глицерина, при культивировании *Komagataella phaffii* YIB- Δ leu2 на стадии линейного роста. На рисунке 5 представлен график, отражающий удельную скорость потребления глицерина.

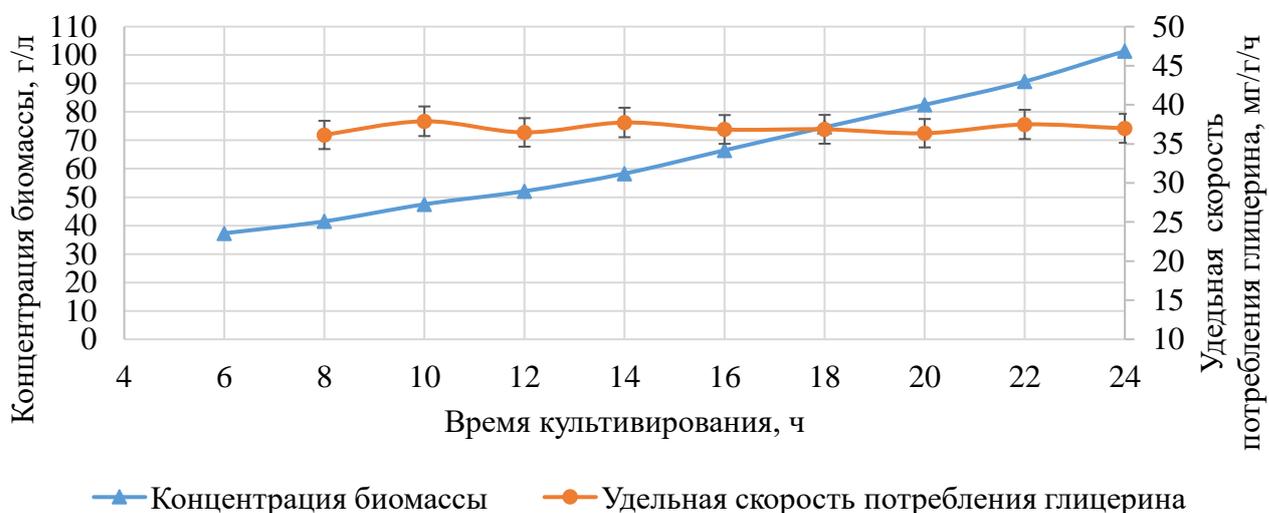


Рисунок 5. Удельная скорость потребления глицерина

Расчет скорости потребления глицерина проводился по формуле 2.

$$\mu G = \frac{S_0 - S_x * 10}{C * t} \times 1000$$

Где:

μG – скорость потребления глицерина, мг/г*ч

S_0 – начальная концентрация глицерина, %

S_x – конечная концентрация глицерина, %

10 – коэффициент пересчета % в мг/л

C – средняя концентрация биомассы, г/л;

t – время исследования, ч

1000 – коэффициент пересчета в мг/г.

Удельная скорость потребления глицерина составила 36,9 мг/г*ч.

IV. ИНДУКЦИЯ АОХ1-ПРОМОТОРА

С целью обеспечения эффективной экспрессии АОСХ1-промотора проведен расчет потребления метанола культурой *Komagataella phaffii* YIB Δ ley2_PLA2Sv. На основании полученных данных построен график, отражающий ключевые характеристики культивирования (рисунок 6.).

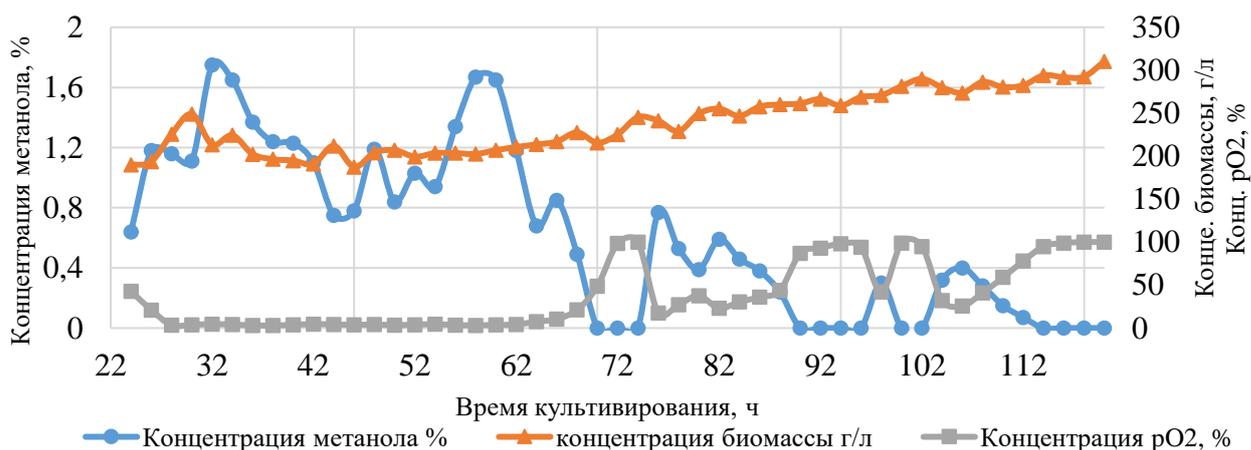


Рисунок 6. Динамика потребления метанола при культивировании *Komagataella phaffii* YIB Δ ley2_PLA2Sv

Расчет требуемого количества метанола рассчитывали по формуле 3.

$$M = \frac{X_0 * q_m}{1000 * V * k_t}$$

Где:

X_0 – начальная концентрация биомассы, г/л;

q_m – удельная скорость потребления метанола, мг/г*ч (19,2);

V – рабочий объем питательной среды в ферментере, л;

k_t – периодичность внесения метанола, ч⁻¹;

1000 – перевод в г/г*ч.

При апробации индукции АОХ1 промотора уровень продуктивности составил 1,87 г/л рекомбинантного белка (Фосфолипаза А2) в течение 96 ч, при этом концентрация метанола в среде поддерживалась в диапазоне от 0,6% до 2,0%.

V. ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ФОСФОЛИПАЗЫ A2

На основании результатов проведенных исследований разработана технологическая схема получения ферментного препарата фосфолипазы A2. Технологическая блок-схема представлена на рисунке 8.

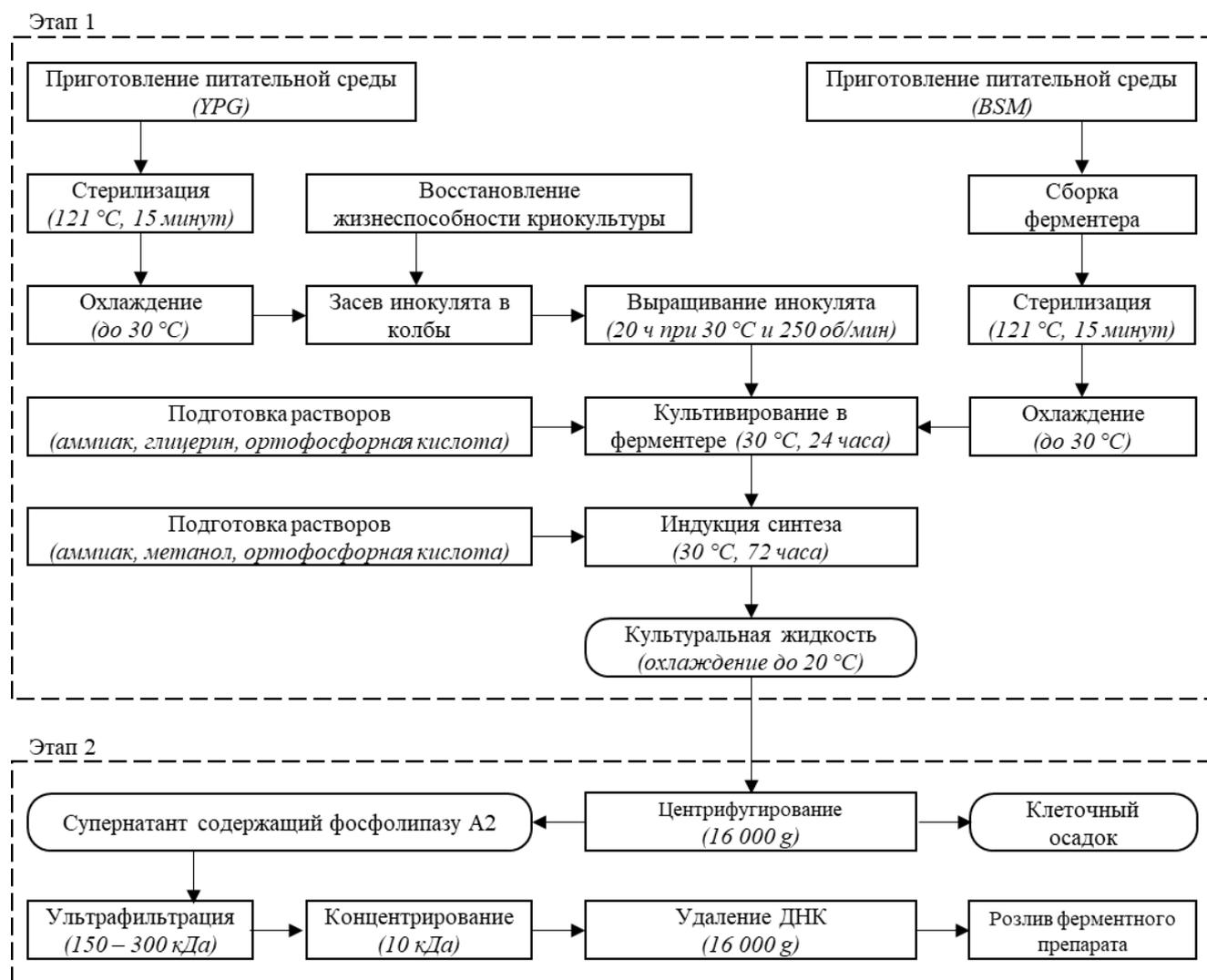


Рисунок 8. Блок-схема получения фосфолипазы A2

Для обеспечения требуемой степени и эффективности концентрирования фосфолипазы A2 проведена оценка селективности керамических фильтров. На первом этапе определена селективности по полиэтиленгликолю (ПЭГ), в соответствии с NF X 45-103 ICS: 71.120.01 «Membranes poreuses».

Расчет селективности проводили по формуле 4.

(4)

$$T_R(i) = [1 - C_p(i)/C_a(i)] \times 100$$

Где:

T_R – селективность, %

C_p – массовая доля ПЭГ в фильтрате, %

C_a – массовая доля ПЭГ в исходном растворе, %

i – показатель молекулярной масса ПЭГ.

Полученные значения селективности фильтрационных модулей по ПЭГ представлены на рисунке 9.

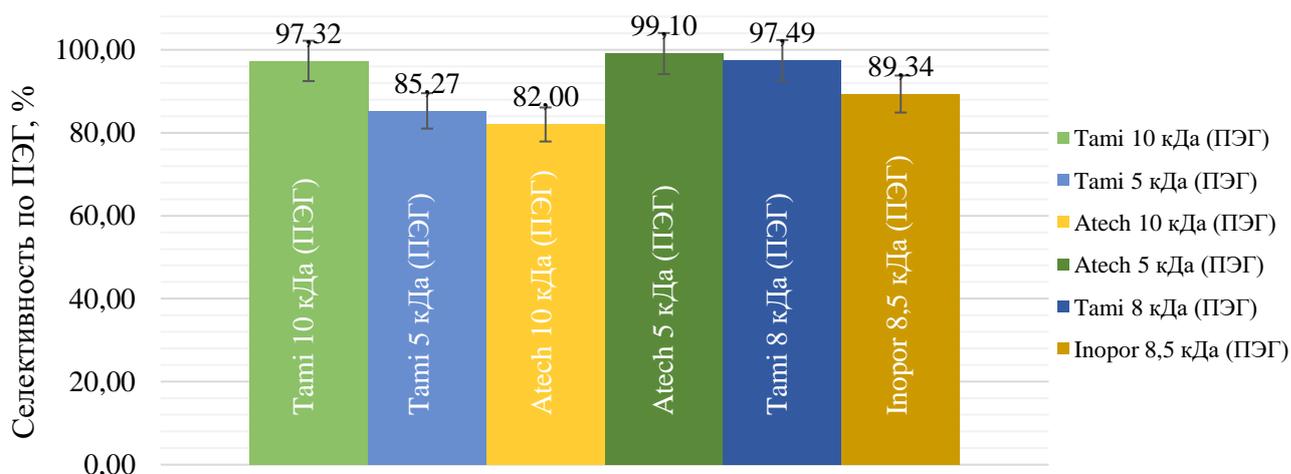


Рисунок 9. Оценка селективности фильтров по ПЭГ

Экспериментальные данные показали, что фильтрационные модули Tami 10 кДа, Tami 8 кДа и Atech 5 кДа обладали высокой степенью селективности, в диапазоне от 97,3 % до 99,1 %.

Для оценки селективности фильтров в качестве тестируемого раствора использовался модельный раствор, содержащий фосфолипазу А2. Полученные значения представлены на рисунке 10.

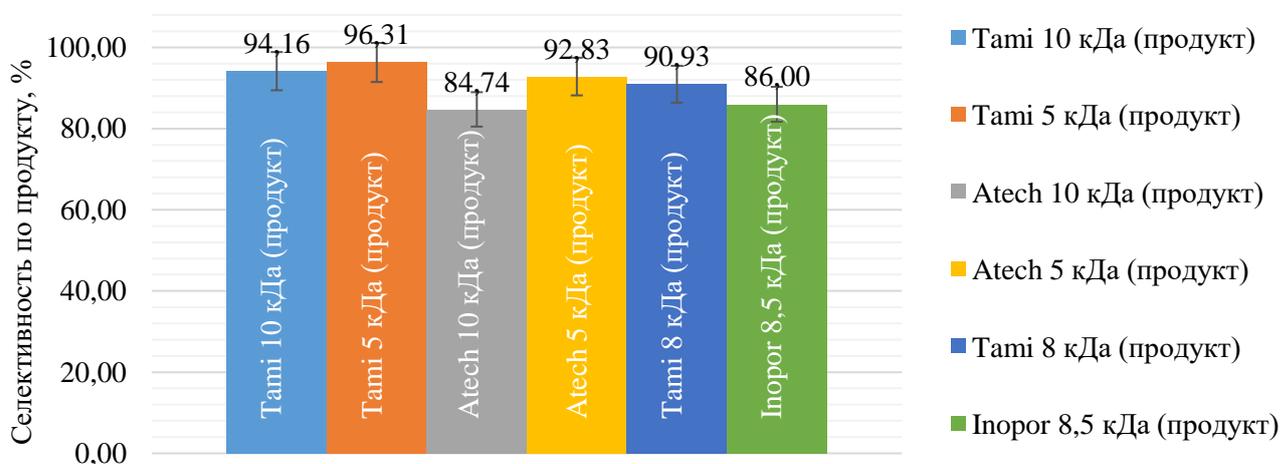


Рисунок 10. Оценка селективности фильтров по фосфолипазе А2

В серии экспериментов установлено, что оптимальной селективностью обладали фильтры Tami 10 кДа, Tami 8 кДа и Atech 5 кДа которые могут быть рекомендованы для концентрирования фосфолипазы А2 в промышленном масштабе.

При достижении высокой концентрации фермента в растворе возможно агрегирование белка и снижение удельной ферментативной активности, в связи с чем определена оптимальная степень концентрирования белкового раствора фосфолипазы А2. Экспериментальные данные показали, что при концентрации фермента в растворе более 8,74 мг/мл, происходило значительное снижение ферментативной активности. Результаты представлены на рисунке 11.

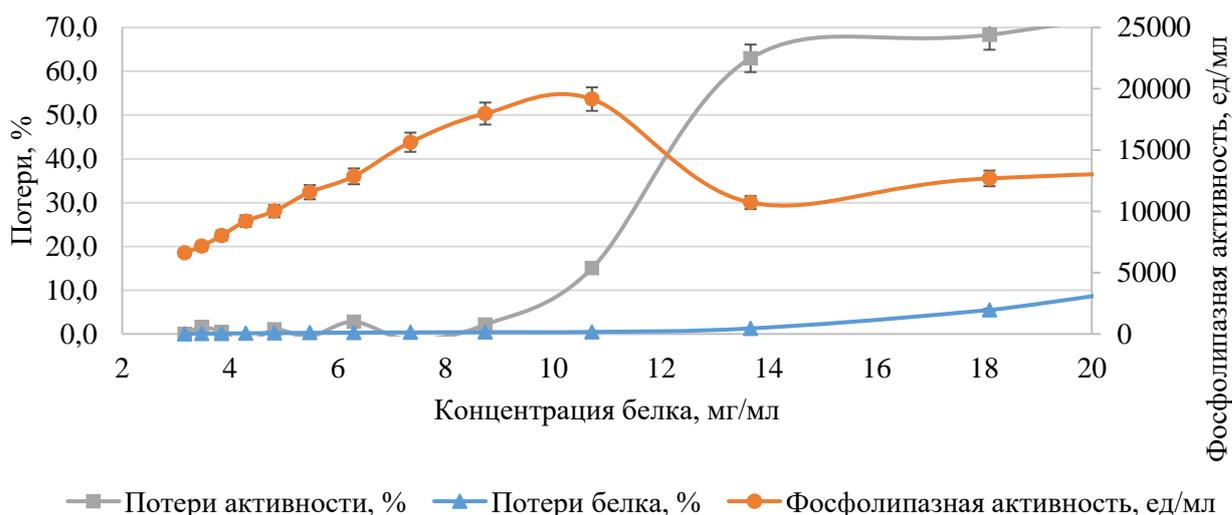


Рисунок 11. Изменение активности фосфолипазы в процессе концентрирования
 В соответствии с требованиями МУ 2.3.2.1830-04 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов», разработана технология удаления ДНК из раствора фосфолипазы А2 сорбционным методом. ПолиДАДМАХ вносили в раствор фосфолипазы А2, при непрерывном перемешивании.

После завершения сорбции полученный раствор очищали от ПолиДАДМАХ с применением мембранного фильтра сечением пор 0,22 мкм. Полученный фильтрат исследовали на ферментативную активность и наличие ДНК штамма-продуцента методом ПЦР. На рисунке 12 показаны полученные результаты.

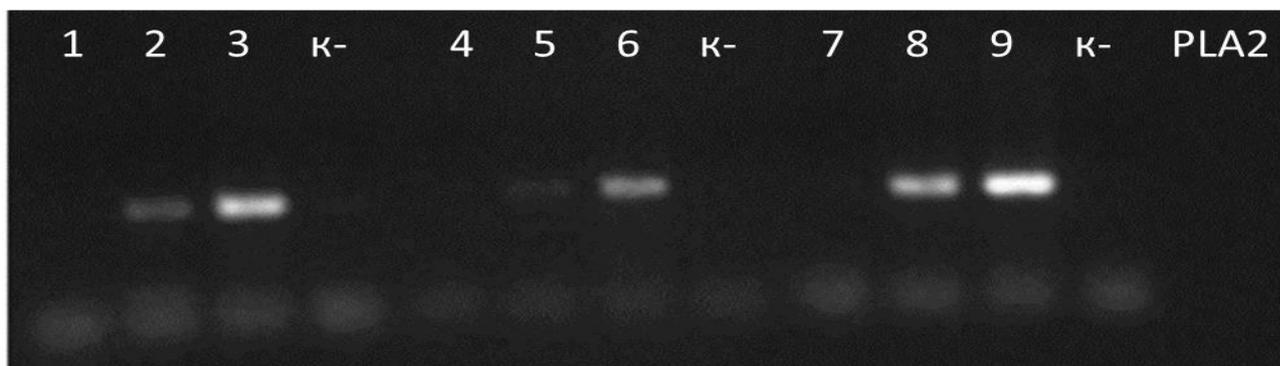


Рисунок 12. Влияние ПолиДАДМАХ на сорбцию ДНК из раствора фосфолипазы
 Где: 1 – 9 образцы

Параметры сорбции (количество ПолиДАДМАХ, мг/л / время сорбции):
 1- 40/30; 2- 30/60; 3- 10/30; 4- 50/30; 5- 30/30; 6- 10/60; 7- 60/30; 8- 20/60; 9- 20/30;
 к- отрицательный контроль

Установлено, что ПолиДАДМАХ эффективно сорбирует ДНК штамма-продуцента при концентрации в растворе от 40 мг/л до 60 мг/л. Однако, при концентрации сорбента более 50 мг/л происходит потеря ферментативной активности, в связи с чем оптимальной дозировкой сорбента следует считать 40 мг/л при экспозиции 30 минут.

VI. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА

Определения оптимального значения рН действия фермента проводилось путем ферментации соевого лецитина с м.д. 4 %, в течение 5 минут при значениях рН в диапазоне от 4 до 10. Расчет ферментативной активности проводили в соответствии с инструкцией «Определения относительной ферментативной активности PLA2 потенциометрическим методом». Полученные результаты показаны на рисунке 13.

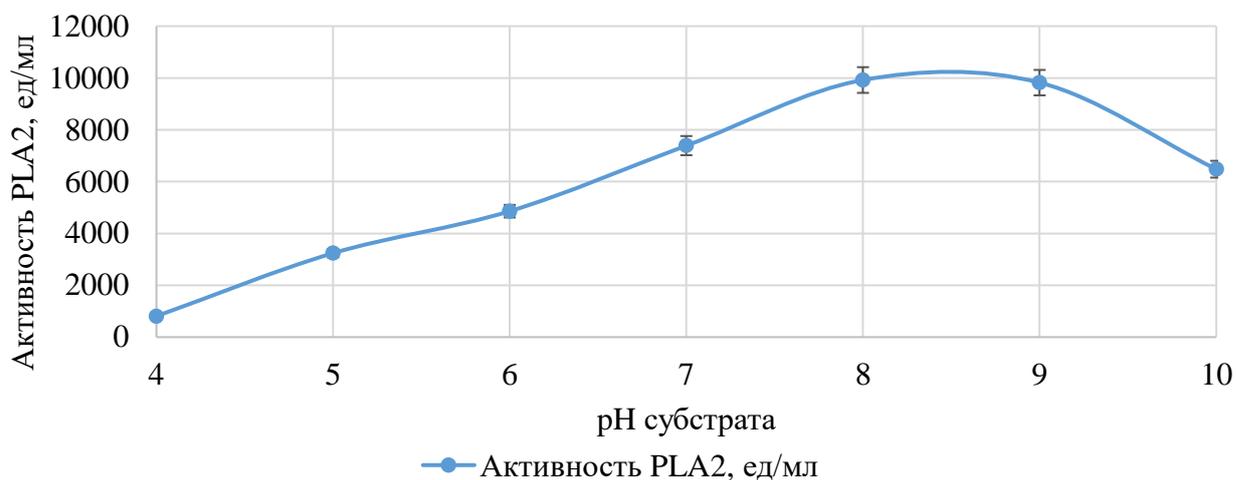


Рисунок 13. Влияние рН на активность фосфолипазы А2

Из рисунка видно, что наибольшая ферментативная активность проявляется при рН 8,5.

Определение оптимальной температуры действия фермента проводили при температуре от 30 °С до 70 °С. Полученные экспериментальные данные указывают на то, что наибольшую ферментативную активность ферментный препарат проявляет при 50 °С. Результаты показаны на рисунке 14.

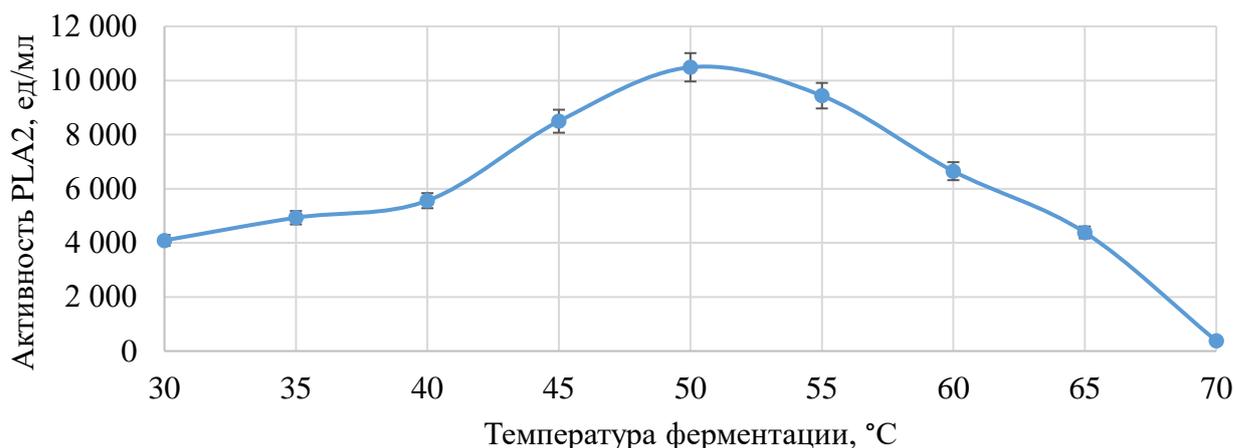


Рисунок 14. Влияние температуры субстрата на активность фосфолипазы А2

Исследование термостабильности фермента проводили в диапазоне температур от 40 °С до 70 °С и времени нагрева от 5 минут до 60 минут. На основании полученных экспериментальных данных построена модель поверхностного отклика (RSM) с помощью программного обеспечения MODDE

12.1 (MODeling and DEsign) Sartorius (Германия). Модель поверхностного отклика представлена на рисунке 15.

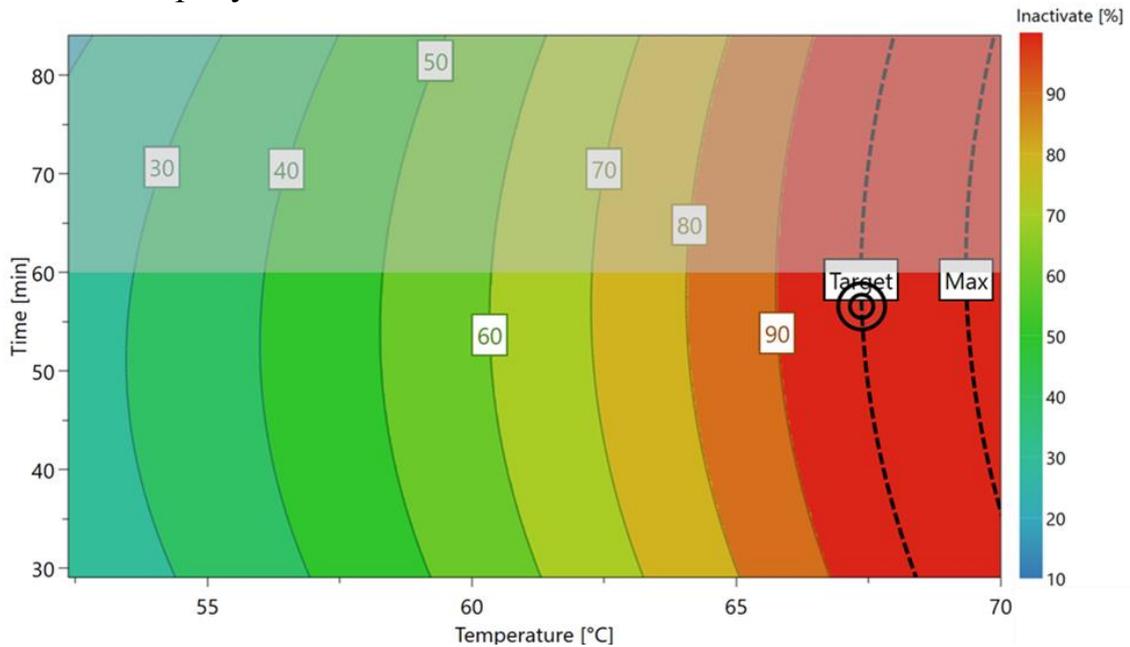


Рисунок 15. Влияние температуры и времени на инактивацию фосфолипазы A2

Результаты исследования показали, что полное подавление активности фермента достигалось при 67,4 °С за 56 минут, что обеспечивает возможность инактивации ферментативной активности, без негативного влияния на органолептические показатели конечной продукции.

При хранении ферментного препарата фосфолипазы A2 при температуре от 0 °С до +10 °С, в помещении, исключающем попадание прямых солнечных лучей, установлено снижение ферментативной активности за 12 месяцев, не более чем на 12,5 %, что свидетельствует о высокой хранимоспособности ферментного препарата. Полученные экспериментальные данные приведены на рисунке 16.

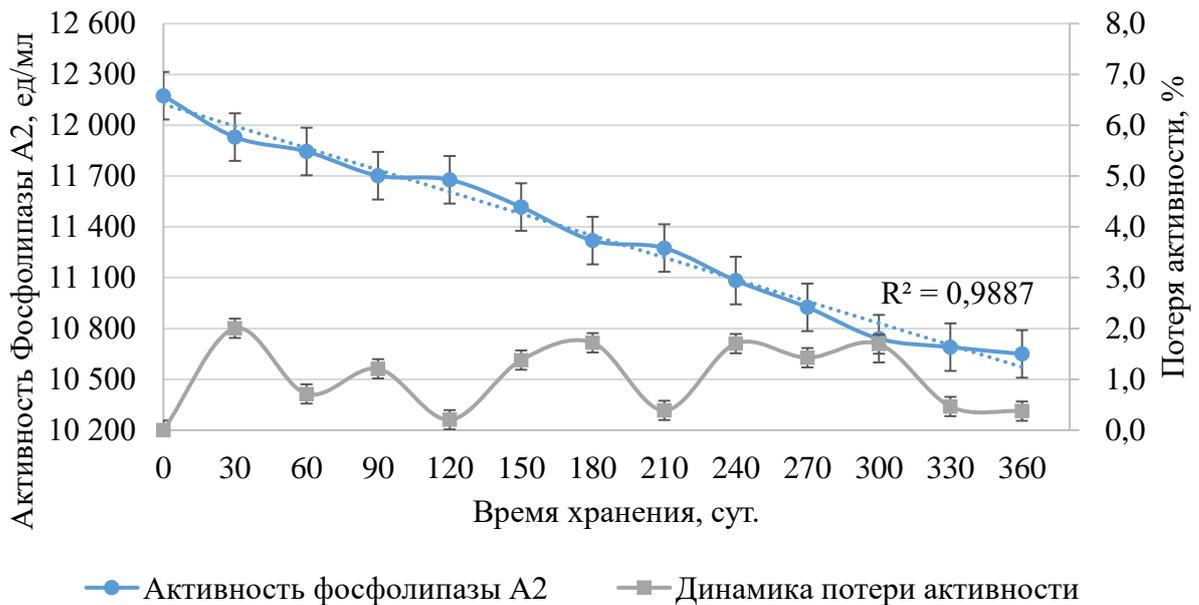


Рисунок 16. Динамика активности фосфолипазы A2 в процессе хранения

Представлены результаты исследования физико-химических и потребительских характеристик разработанного ферментного препарата, в сравнении с наиболее востребованными коммерческими ферментными препаратами, содержащими фосфолипазу А2 и применяемыми с целью ферментации яичного желтка. Результаты представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Сравнение физико-химических показателей различных фосфолипаз

Показатели	Характеристика показателя		
	Nagase (Nagase Corp.)	Махарал (DSM)	Фосфолипаза А2 (опытная)
Активность, ед/мл	10 000 – 13 000	10 500	10 500
Оптимум действия рН	Нет данных	4,8 – 5,2	5,5 – 6,0
Концентрация белка, г/л	3,1	6,3	2,0

Таблица 2. Сравнение условий ферментации яичного желтка различными фосфолипазами

Показатели	Характеристика показателя		
	Nagase (Nagase Corp.)	Махарал (DSM)	Фосфолипаза А2 (опытная)
Продолжительность ферментации, ч	4	3	4
Температура ферментации, °С	50 – 55	41 – 42	50 – 55
Требуемое количество NaCl, %	7,5	–	7,5
Дозировка фермента, % к массе желтка	0,20	0,10	0,12

Представленные данные свидетельствуют о том, что полученный ферментный препарат «Фосфолипаза А2» соответствует лучшим аналогам.

VII. НАРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАРТИИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ФОСФОЛИПАЗА А2

Для проведения опытно-промышленной апробации разработанного ферментного препарата фосфолипазы А2 проведена наработка экспериментальной партии пищевой продукции (майонеза) с применением полученного ферментного препарата. Апробация проводилась на базе ООО «ИЦ «Бирюч-НТ», в результате которой получено 25 кг пищевой продукции.

В ходе исследования полученной пищевой продукции установлено, что органолептические характеристики соответствуют требованиям ГОСТ 30363-2013.

Также показано соответствие наработанной пищевой продукции требованиям ГОСТ 30363-2013; ГОСТ 32149-2013; ГОСТ 10444.11-2013; ГОСТ 1044.12-2013 (таблица 4).

Таблица 4. Результаты исследования пищевой продукции

Наименование показателя	Требования	Результаты	Заключение
М.д. сухого в-ва, % не менее	46,0	48,7	Соответствует
М.д. доля жира, % не менее	26,0	26,2	Соответствует
М.д. доля белковых веществ, % не менее	13,0	13,7	Соответствует
М.д. хлористого натрия, % не менее	6,0-8,0	7,9	Соответствует
М.д. свободных жирных кислот, %	7,0-14,0	8,9	Соответствует
Альфа-амилазный тест	Отрицательный	Отрицательный	Соответствует
Посторонние примеси	Не допускаются	Не обнаружены	Соответствует
БГКП, в 0,1 г	Не допускаются	Не обнаружены	Соответствует
КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	$5,0 \times 10^2$	$9,0 \times 10^1$	Соответствует
Патогенные, в т.ч. Salmonella, в 25 г	Не допускаются	Не обнаружены	Соответствует
S. aureus, в 1,0 г	Не допускаются	Не обнаружены	Соответствует
Протей, в 1,0 г	Не допускаются	Не обнаружены	Соответствует
Мезофильные молочнокислые бактерии, КОЕ/г	Не допускаются	Не обнаружены	Соответствует
Дрожжи и плесени, КОЕ/г, не более	1×10^1	Не обнаружены	Соответствует
Срок годности: при температуре от +4 до +20 °С, суток	28	28	Соответствует

По результатам наработки и исследования опытного образца пищевой продукции, полученного с использованием ферментного препарата PLA2 показано, что качество пищевой продукции, полученной с применением ферментного препарата PLA2 соответствует требованиям по всем исследуемым характеристикам, что подтверждает то, что разработанный ферментный препарат фосфолипазы A2 не уступает импортным аналогам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения настоящего диссертационного исследования, на основании экспериментальных данных и данных, полученных методом математического моделирования, разработана технология получения ферментного препарата «Фосфолипаза А2».

1. Получен ауксотрофный штамм *Komagataella phaffii* YIB- Δ leu2 не способный к росту на питательной среде без лейцина, на основе штамма-реципиента *Komagataella phaffii* Y-3489. Полученный штамм депонирован в Биоресурсном Центре Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) под номером Y-4761 и может использоваться в качестве штамма-реципиента.
2. Разработан новый, генно-инженерно-модифицированный штамм-продуцент рекомбинантного белка PLA2, на основе ауксотрофного штамма *Komagataella phaffii* YIB- Δ leu2, обеспечивающий экспрессию целевого белка. Полученный штамм депонирован в БРЦ ВКПМ под номером Y-4513.
3. Установлено, что разработанный штамм *Komagataella phaffii* YIB- Δ leu2, при культивировании на модифицированной питательной среде BSM, при pH 6,2 \pm 0,1, температуре 29,6 \pm 0,4 и количестве инокулята от 5 % до 10 %, способен синтезировать фосфолипазу А2 с удельной активностью 2 093 \pm 52 ед/мг белка.
4. Установлено, что при культивировании штамм *Komagataella phaffii* YIB- Δ leu2 на питательной среде, содержащей метанол в количестве от 0,6 до 2,0 %, обеспечивается индукция АОХ1-промотора и экспрессия не менее 1,87 г/л рекомбинантного белка PLA2 за 96 ч.
5. Получен ферментный препарат на основе штамма-продуцента, обладающий фосфолиполитической активностью 17 979 ед/мл, что не уступает зарубежным аналогом фосфолипазы.
6. Показано, что при значениях pH 8,5 и температуре 50 °С фосфолипаза А2 обладала наибольшей ферментативной активностью. Установлено, что полное подавление активности фермента достигалось при 67,4 °С и времени экспозиции 56 минут. Установлено, что через 12 месяцев хранения ферментного препарата ферментативная активность составила 10 500 ед/мл, что соответствует снижению активности не более чем на 12,5 %.
7. Показано, что опытная партия пищевой продукции, полученная с применением разработанного ферментного препарата фосфолипазы А2 соответствует требованиям ГОСТ.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus:

1. A. Rozanov. Production of subtilisin proteases in bacteria and yeast / A.S. Rozanov, S.V. Shekhovtsov, N.V. Bogacheva, E.G. Pershina, A.V. Ryapolova, D.S. Bytyak, S.E. Peltek // Vavilov Journal of Genetics and Breeding – 2021. Т: 25 №1, P. 125 – 134.
2. Filkin S. Expression, purification and biophysical characterization of recombinant *Streptomyces violaceoruber* phospholipase PLA2 overproduced in *Pichia pastoris* / S. Y. Filkin, A. A. Zenin, A. V. Lipkin, A. A. Sichev, D. S. Bytiak // Preparative Biochemistry & Biotechnology. 2020. - Vol. 50. - PP. 549-555.

Публикации в изданиях из перечня ВАК Минобрнауки России:

3. Бытык Д. С. Разработка стратегии индукции АОХ1 промотора при культивировании метилотрофных дрожжей *Komagataella phaffii* / Д. С. Бытык, О. С. Корнеева, Е. А. Мотина // Вестник ВГУИТ – 2021. Т. 83, № 1, С. 115 – 120.
4. Бытык Д. С. Сравнительная экспрессия рекомбинантной фосфолипазы А2 в *Komagataella phaffii* в зависимости от модификации сигнального пептида альфа-фактора / Д. С. Бытык, Ю. А. Гладченко, А. В. Ряполова, О. С. Корнеева, Е. А. Мотина // Вестник ВГУИТ – 2021. Т. 83, № 1, С. 263 – 269.
5. Бытык Д. С. Практические подходы к биосинтезу рекомбинантных белков / Д. С. Бытык, Г. В. Хорошилова, А. Б. Гнеушев, П. Г. Сидоров, Д. А. Гусаров // Биофармацевтический журнал – 2022. Т. 14. № 6, С. 44 – 48.

Публикации в других изданиях и материалах конференций:

6. Бытык Д. С. Разработка технологии культивирования метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* – продуцента рекомбинантного белка фосфолипаза А2 / Д. С. Бытык, С. В. Кирьянова, Д. А. Черенков, Т. В. Санина // Актуальная биотехнология – 2017. Т. 24, № 1, С. 324.
7. Бытык Д. С. Разработка технологии высокоплотного культивирования *Pichia pastoris* / Д. С. Бытык // Актуальная биотехнология – 2018. Т. 26, № 3, С. 113.
8. Бытык Д. С. Анализ селективности фильтрационных систем при концентрировании рекомбинантных белков / Д. С. Бытык, О. С. Корнеева // Программа LIX отчетной конференции преподавателей и научных сотрудников ВГУИТ за 2020 год – 2021.

Патенты:

9. Пат. № 2676321 РФ, МПК С12N 15/52, С12N 15/81, С12N 1/19, С12N 1/84, С12N9/18. Способ получения ферментного препарата фосфолипазы А2 с применением рекомбинантного штамма-продуцента *Pichia pastoris* X-33/ pPICZαA-PhoA2-StV / А. Б. Беклемишев, С. В. Кирьянова, Р. Л. Анисимов, К. В. Смирнов, А. А. Сычев, Д. С. Бытык; заявитель и патентообладатель ООО «ИЦ «Бирюч-НТ». № 2018108650; заявл. 07.03.2018; опубл. 27.12.2018, Бюл. № 36.
10. Пат. № 2746817 РФ, МПК С12N 15/81. Способ получения штамма-продуцента фосфолипазы А2 *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) Y1B Δ*leu2*_PLA2Sv / Д. С. Бытык, Ю. А. Гладченко, А. В. Ряполова, Д. М. Музаев; заявитель и патентообладатель ООО «ИЦ Бирюч-НТ». № 2020119338; заявл. 10.06.2020; опубл. 21.04.2021, Бюл. № 12.

Свидетельства о регистрации:

11. Свидетельство об аттестации методики измерений № 142/09-01.00272-2020. Определения остаточной активности фермента фосфолипаза А2 титриметрическим методом / Заявитель и правообладатель ООО «ИЦ «Бирюч-НТ», опубл. 30.06.2020.