

ПОИСК ОПТИМАЛЬНОГО СИГНАЛЬНОГО ПЕПТИДА ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ СЕКРЕЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФИТАЗЫ ДРОЖЖАМИ *PICNIA PASTORIS*

Д.С. Бульмакова, А.Д. Сулейманова, М.Р. Шарипова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

В полноценном питании животных и птиц особое значение имеет фосфор. Он является одним из основных структурных компонентов организма, входит в состав важнейших метаболитов, принимает активное участие во многих обменных, энергетических и регуляторных процессах. Фосфор семян растений, используемых в качестве кормов, недоступен для питания животных, поскольку основная его часть находится в неусвояемой форме фитатов. Помимо того, фитаты могут образовывать комплексы с белками и ионами металлов, что также снижает их биодоступность. Перспективной стратегией в решении данной проблемы является добавление в корма животных специфических микробных ферментов – фитаз, способных гидролизовать фитат. В свою очередь, использование ферментов в промышленности подразумевает масштабирование процессов их синтеза путем создания эффективных экспрессионных систем. Для получения многих рекомбинантных белков широко применяются дрожжи *Pichia pastoris*, характеризующиеся высоким уровнем экспрессии за счет сильных и регулируемых промоторов, а также подбора эффективных сигнальных пептидов. Цель работы – поиск оптимального сигнального пептида для эффективной секреции фитазы AgpP бактерии *Pantoea* sp. 3.5.1 дрожжами *Pichia pastoris*.

На первом этапе работы были получены генетические конструкции для внеклеточной продукции бактериальной фитазы дрожжами на основе низкокопийного дрожжевого вектора pPINK-LC с индуцибельным промотором AOX1 и набора сигнальных пептидов (генов α -амилазы *Aspergillus niger*, α -фактора *Saccharomyces cerevisiae* и инулиназы *Kluyveromyces fragilis*). Для трансформации полученных конструкций использовали штамм *Pichia pastoris* PichiaPink4, который является ауксотрофом по аденину и не способен расти при его отсутствии в среде. Интеграция в геном дрожжей экспрессионных конструкций позволяет ему расти на среде без аденина. Способность трансформированных штаммов *P. pastoris* экспрессировать и секретировать фитазу в культуральную жидкость оценивали с помощью иммуноблоттинга и анализа фитазной активности. Показано, что бактериальная фитаза AgpP экспрессируется в дрожжевых клетках на уровне трансляции и секретируются в культуральную жидкость. Для подбора оптимального для секреции белка сигнального пептида измеряли внутриклеточную и внеклеточную активность фитазы. У штаммов, трансформированных конструкцией, содержащей сигнальный пептид гена инулиназы, максимальное значение внеклеточной и минимальное значение внутриклеточной активности фитазы обнаружено на 36-й час культивирования и составило 3.8 ед./мл и 0.85 ед./мл, соответственно. Трансформанты с сигнальными пептидами генов α -амилазы и α -фактора максимального значения внеклеточной активности фермента достигли так же на 36-й час роста культуры, что составило 3.65 ед./мл и 2.86 ед./мл, соответственно. Внутриклеточная активность фитазы при этом составила 0.61 ед./мл и 0.52 ед./мл, соответственно. Полученные результаты о максимальных и минимальных значениях активности белка подтверждали иммуноблоттингом. Таким образом, наиболее эффективным сигнальным пептидом для секреции бактериальной гистидинової кислотной фитазы AgpP *Pantoea* sp. 3.5.1 дрожжами *P. pastoris* является сигнальный пептид гена инулиназы *Kluyveromyces fragilis*.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 16-16-04062.