

УДК 579.222

**НОВЫЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ПРОДУЦЕНТ КОРМОВОГО
ФЕРМЕНТА ЭНДО–1,3(4)-В-ГЛЮКАНАЗЫ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *KOMAGATAELLA*
*KURTZMANII***

Л.Н. Борщевская, Т.Л. Гордеева, А.Н. Калинина, С.П. Синеокий, А.С. Федоров

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва, Россия

Эндо–1,3(4)--глюканаза относится к одному из самых востребованных в промышленности ферменту и широко применяется в качестве добавки к кормам сельскохозяйственных животных с однокамерным желудком, эндогенно катализируя гидролитическое расщепление внутренних β -1,3- и β -1,4–связей в β -глюканах.

β -глюкан – водорастворимый некрахмальный полисахарид, содержащийся в зерновых компонентах комбикормов (в овсе – 0,67 %, ржи – 0,18 %), действует как анти-питательный агент. В результате действия β -глюканов происходит нарушение процессов пищеварения из-за недоступности питательных веществ для пищеварительных ферментов животного.

Наиболее эффективным способом снижения негативного влияния β -глюкана на ЖКТ является применение ферментных препаратов на основе эндо – 1,3(4) - β -глюканаз. При вводе эндо – 1,3(4) - β -глюканаз в комбикорма для птицы и свиней повышается усвояемость питательных веществ, что приводит к улучшению продуктивности и конверсии корма.

Импорт препаратов на основе ферментов, расщепляющих некрахмалистые полисахариды, составляет 21,39 млн. USD, или 68 % от рынка в стоимостном выражении. В России свыше 80 % ферментных препаратов, необходимых для животноводства, импортируется из-за рубежа. Стоит отметить, что на рынке РФ не представлено ни одного моноферментного препарата β -глюканазы.

Разработка высокоактивных отечественных рекомбинантных штаммов-продуцентов β -глюканаз и масштабируемых технологий ферментации для импортозамещения ферментных кормовых добавок является актуальной задачей.

В настоящее время наиболее перспективным является разработка продуцентов ферментов на основе дрожжей, что представляет большой интерес с научной и технологической точки зрения, поскольку дрожжи более удобны для проведения генно- инженерных работ и быстрее накапливают целевой фермент в сравнении с грибными продуцентами, а также позволяют получить моноферментные препараты. В частности, для этих целей широко используются метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris*. Они обладают мощными системами экспрессии и секреции рекомбинантных белков.

В нашей лаборатории был получен рекомбинантный штамм-продуцент β -глюканазы на основе экспрессионной системы дрожжей *Komagataella kurtzmanii* ВКПМ Y-4464. Штамм содержит 6 копий гена, кодирующего эндо-1,3-1,4- β -глюканазу из *Bacillus pumilus* под контролем индуцибельного промотора AOX1. Для получения штамма с несколькими копиями была использована стратегия конструирования многокассетных генетических конструкций, содержащих несколько tandemно расположенных копий кассет для экспрессии генов β -глюканаз. Также была разработана методика отбора штаммов дрожжей с многокопийными вставками генов β -глюканазы в составе хромосомы.

В лабораторном ферментере продуктивность штамма составила 10000 ед./мл культуральной жидкости за 164 часа культивирования.

В ходе работы были разработаны элементы масштабируемой технологии ферментации штамма ВКПМ Y-4464, выделения и очистки ксиланазы с использованием испытательного стенда в объемах ферментаций 10/100 л на базе консорциума, в который входят НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, АО «Биоамид» и ООО ПО «Сиббиофарм».

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI60717x0179) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика.