

УДК 579.222

**НОВЫЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ПРОДУЦЕНТ КОРМОВОГО
ФЕРМЕНТА ФИТАЗЫ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *PICNIA PASTORIS***

**Т.Л. Гордеева¹, Л.Н. Борщевская¹, А.Н. Калинина¹, С.П. Синецкий¹, С.П. Воронин²,
М.Д. Каширская²**

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИ Генетика, Москва, Россия

² АО «Биоамид, Саратов, Россия

Для улучшения питательных свойств растительных кормов широко применяются ферменты фитазы микробного происхождения, катализирующие гидролиз фитатов с отщеплением неорганического фосфата.

Фитаты (мио-инозитол гексакисфосфаты), в виде которых растения запасают фосфор, практически не усваиваются организмом животных с однокамерным желудком и домашней птицей. Значительная доля неусвоенного фосфора выводится с экскрементами из организма и загрязняет окружающую среду. Кроме того, фитаты являются хелатирующими агентами, снижающими пищевую ценность кормов. Введение фитаз в растительные корма повышает усвоение фосфора, кальция, микроэлементов, белков и аминокислот желудочно-кишечным трактом животных.

В настоящее время фитазы получают микробиологическим путем с использованием рекомбинантных штаммов-продуцентов. В частности, для этих целей широко используются метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris*. Для них разработаны питательные среды и отработан процесс ферментации с использованием культуры высокой плотности. Кроме того, они обладают мощными системами экспрессии и секреции рекомбинантных белков, в том числе, фитаз. На российский рынок препараты фитаз поставляются, в основном, зарубежными компаниями. Разработка высокоактивных отечественных рекомбинантных штаммов-продуцентов кормовых ферментов фитаз и масштабируемых технологий ферментации для импортозамещения ферментных кормовых добавок является актуальной задачей.

В нашей лаборатории на основе дрожжей *P. pastoris* был создан высокоэффективный рекомбинантный многокопийный продуцент фитазы *Escherichia coli* с использованием Cre-lox системы. Для увеличения уровня экспрессии рекомбинантного фермента последовательность нативного гена, кодирующего фитазу *E. coli*, была оптимизирована с учетом частот встречаемости кодонов у эффективно экспрессирующихся генов в дрожжах *P. pastoris*. Полученная синтетическая последовательность *phyEc-mod* имеет 73,76 % гомологии с последовательностью нативного гена. Синтетический ген *phyEc-mod* был клонирован в интегративный экспрессионный вектор под контролем модифицированного индуцибельного промотора AOX1. Секреция фитазы в культуральную жидкость обеспечивалась модифицированным сигнальным пептидом на основе пре-про-последовательности α -фактора дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Для улучшения фолдинга и секреции рекомбинантного фермента в хромосому дрожжевого штамма был интегрирован ген *HAC1* из *S. cerevisiae*, кодирующий активатор транскрипции генов ответа клетки на несвернутый белок (UPR – unfolded protein response). Проведение ПЦР в режиме «реального времени» показало, что в хромосоме полученного штамма интегрировано 11 копий гена *phyEc-mod*.

Был разработан эффективный процесс ферментации штамма в лабораторном ферментере с минеральной средой и подпиткой метанолом, позволяющий получить культуральную жидкость с фитазной активностью не менее 23700 ед./мл за 160 часов культивирования. На базе Индустриального партнера ООО «ПО «Сиббиофарм» отработана и оптимизирована технология ферментации штамма-продуцента фитазы на ферментере объемом 8 м³. Отработана технология выделения и переработки фитазы, получены сухие формы препарата.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI57917x0145) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика.