

УДК 579.222

**НОВЫЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ПРОДУЦЕНТ КОРМОВОГО
ФЕРМЕНТА ЭНДО – 1,4-В-D-КСИЛАНАЗЫ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *PICHLIA PASTORIS***

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

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва, Россия

Ксилан – основной представитель трудногидролизуемых некрахмалистых полисахаридов, содержащихся в зерне, основная цепь которого состоит из остатков β -D-ксилозы, соединенных между собой (1,4)–связями. Содержание ксилана в компонентах комбикормов превышает 25 %, что затрудняет пищеварение и усвоение питательных веществ рациона моногастричными животными.

Основную роль в разрушении ксилана играет эндо–1,4- β -D-ксилаза (ЕС 3.2.1.8), которая катализирует гидролитическое расщепление 1,4- β -ксилозидных связей в ксилане. Ксиланазы широко применяются на практике для улучшения питательных свойств кормов. Они способствуют нейтрализации антипитательных свойств полисахаридов, находящихся в кормах из зерна злаковых культур, чем обеспечивают повышение усвояемости питательных веществ корма, улучшение микробиологической среды кишечника за счет снижения вязкости перевариваемого субстрата.

В отечественной промышленности до настоящего времени используются, в основном, микробные штаммы-продуценты кормовых ферментов, созданные на основе грибов рода *Trichoderma*, *Aspergillus* и *Penicillium*.

Такие штаммы синтезируют ограниченный ассортимент ферментов, имеют относительно невысокую продуктивность, продуцируют, помимо ксиланазы, ряд других ферментов, что не позволяет использовать их при производстве моноферментных препаратов. Кроме того, свойства синтезируемых ферментов не всегда соответствуют требованиям технологических процессов, в которых они могут применяться. Также отмечается высокая импортозависимость в сфере кормовых ферментных препаратов на российском рынке (приблизительно 80 %).

Сегодня наиболее перспективным направлением является создание продуцентов ферментов на основе рекомбинантных штаммов метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. Дрожжи *P. pastoris* способны вырастать до очень высоких плотностей с использованием несбраживаемых источников углерода – глицерина, метанола, что позволяет получать высокие уровни гетерологичного белка.

Разработка высокоактивных отечественных рекомбинантных дрожжевых штаммов-продуцентов кормовых ферментов и создание на их основе конкурентоспособных ферментных препаратов является актуальной задачей.

В нашей лаборатории был получен рекомбинантный штамм-продуцент ксиланазы на основе экспрессионной системы дрожжей *Pichia pastoris* ВКПМ Y-4461. Штамм содержит 8 копий гена, кодирующего эндо-1,4-β-D-ксиланазу из *Paenibacillus brasilensis* под контролем индуцибельного промотора АОХ1. Для получения штамма с несколькими копиями целевого гена была использована тактика последовательной интеграции экспрессионной кассеты с последующим выщеплением маркерного гена, а также разработана методика отбора наиболее продуктивных трансформантов.

В лабораторном ферментере продуктивность штамма составила 30000 ед./мл культуральной жидкости за 164 часа культивирования.

В ходе работы были разработаны элементы масштабируемой технологии ферментации штамма ВКПМ Y-4461, 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 – RFMEFI60717x0180) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.