

УДК 579.66

НОВАЯ РЕКОМБИНАНТНАЯ ФИТАЗА ИЗ CITROBACTER GILLENII – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ КОРМОВОЙ ФЕРМЕНТ**А.А. Ткаченко, С.П. Синеокий, Т.Л. Гордеева***НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия*

Фосфор – макроэлемент, входящий в состав всех живых организмов. Он присутствует в клетках животных, растений в виде различных неорганических и органических соединений. Неотъемлемой частью всех кормов, применяющихся в животноводстве, являются бобовые и зерновые культуры. До 2/3 неорганического фосфора в данных культурах представлено нерастворимыми солями фитиновой кислоты – фитатами (мио-инозитол 1,2,3,4,5,6 – гексакисфосфатами).

Моногастричные животные (свины, куры, индюшки, утки и рыбы) не способны усваивать фитатный фосфор из-за отсутствия в гастроэнтеральном тракте необходимых ферментов. Кроме того, фитаты активно связывают различные микроэлементы, ионы двухвалентных металлов, белки, аминокислоты в труднодоступные для переваривания комплексы. Для решения данных проблем необходимо использовать высокоэффективные ферментные препараты, содержащие фитазы.

Фитазы (мио-инозитол гексакисфосфат фосфогидролазы (ЕС 3.1.3.8 и 3.1.3.26)) катализируют гидролиз фитатов с поэтапным отщеплением неорганического фосфата. Фитазы получают микробиологически с использованием штаммов-продуцентов, в частности, сконструированных на основе *P. pastoris*. Данные дрожжи прекрасно изучены, считаются безопасными (имеют GRAS статус), характеризуются высокой скоростью роста и возможностью секретиции целевого белка в больших количествах в культуральную жидкость.

Фитазы класса кислых гистидиновых фосфатаз получили наибольшее применение в агробиотехнологии, так как они по свойствам более подходят для работы в ЖКТ животных. Данные фитазы были выделены как из грибов, так и из бактерий.

В настоящее время не найдено фитаз с оптимальным набором свойств, необходимых для эффективного применения в качестве кормовых добавок. Таким образом, актуальным является поиск новых фитаз с промышленно-ценными характеристиками.

Была исследована новая рекомбинантная фитаза PhyCg из *C. gillenbergii*. Ген phyCg, кодирующий PhyCg фитазу, был экспрессирован в *P. pastoris*. Для этого он был оптимизирован по кодоновому составу, синтезирован, клонирован в вектор pPIC9 под контролем индуцибельного промотора гена AOX1. Для отбора трансформантов в векторе предусмотрен селективный маркер HIS4-, а для секретиции фермента в культуральную жидкость – сигнальный пептид, пре-про-последовательность α -фактора дрожжей *S. cerevisiae*. Продуктивность наиболее активного трансформанта составила 187 ед./мл на 48 ч индукции метанолом при культивировании в колбе. Рекомбинантный фермент был выделен, очищен и охарактеризован. Анализ аминокислотной последовательности фермента показал, что зрелый белок состоит из 410 аминокислот и относится к семейству кислых гистидиновых фосфатаз. Аминокислотная последовательность фитазы PhyCg имеет наибольшую гомологию (73,49 %) с последовательностью фитазы из *Citrobacter braakii*. Рекомбинантная фитаза PhyCg обладает высокой удельной активностью, широким диапазоном рабочего интервала pH (сохраняет высокую активность при pH 6,0, что делает ее перспективной кормовой добавкой для аквакультур), высокой устойчивостью к действию pH и кинетическими параметрами, характерными для высокоактивных ферментов.

Таким образом, в ходе работы была показана возможность эффективной экспрессии гена phyCg, кодирующего новую фитазу из *C. gillenbergii*, в *P. pastoris*. Благодаря своим свойствам, новая рекомбинантная фитаза PhyCg может быть рассмотрена в качестве перспективного фермента для агробиотехнологии, а также создания промышленного штамма-продуцента на основе *P. pastoris*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Грант № 075–15–2019–1658 от 31.10.2019 г.) с использованием ресурсов уникальной научной установки – Биоресурсный центр – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов.