

Гиперэксперсия бактериальной фитазы *Pantoea* sp.3.5.1в *Pichia pastoris* и очистка рекомбинантного фермента

Научный руководитель – Шарипова Маргарита Рашидовна

Трошагина Дарья Сергеевна

Аспирант

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия

E-mail: dashunka_@mail.ru

Проблема недостатка усвояемого фосфора в питании животных является актуальной и обусловлена тем, что в кормовом зерне значительная часть фосфора представлена в виде нерастворимого и неусвояемого фитата. Микроорганизмы способны получать необходимый фосфор из фитата благодаря синтезируемым ферментам - фитазам. Поэтому одним из перспективных направлений в решении проблемы дефицита фосфора в питании живых организмов является использование таких ферментов, в частности, в качестве добавок в корма животных. Использование ферментов в промышленности подразумевает масштабирование процессов их синтеза. С этой целью необходимо создание эффективных экспрессионных систем. Система экспрессии на основе дрожжей *Pichia pastoris* широко используется для получения рекомбинантных белков, поскольку обеспечивает высокий уровень продукции за счет сильных и регулируемых промоторов и его секрецию при отсутствии протеолиза.

Цель работы - выделение и очистка бактериальной фитазы AgpP *Pantoea* sp.3.5.1 из культуральной жидкости рекомбинантных дрожжей *Pichia pastoris*.

На предыдущем этапе работы нами были получены рекомбинантные штаммы *Pichia pastoris*, в геном которых интегрирован ген бактериальной фитазы agpP под контролем индуцибельного дрожжевого промотора AOX1 и сигнального пептида гена инулиназы *Kluveromyces marxianus*. Результаты вестерн-блоттинга и определения фитазной активности показали, что бактериальная фитаза экспрессируется и секретируется в культуральную жидкость рекомбинантными дрожжами. Для дальнейшей работы отобрали трансформант с максимальной фитазной активностью 2.8 Ед/мл. Очистку рекомбинантной фитазы проводили на колонке с Ni-NTA сефарозой при различных значениях pH (7.0, 7.5, 8.0). Оптимальным значением для проведения очистки рекомбинантной фитазы из культуральной жидкости дрожжей являлся pH 7.0, при котором получили максимальную удельную активность фитазы 1.12 Ед/мг. В результате очистки в оптимизированных условиях получили гомогенный препарат фитазы с выходом по активности 59.3% и степенью очистки 13.3. Гомогенность препарата устанавливали SDS-электрофорезом в 12.5% ПААГ. Молекулярная масса фитазы, продуцируемой дрожжами, была выше молекулярной массы нативной фитазы и составила 90 кДа против 57 кДа для нативной фитазы. По-видимому, при экспрессии бактериальной фитазы в дрожжах фермент подвергался гликозилированию. После обработки рекомбинантного фермента эндогликозидазой на электрофорезе в 12.5% ПААГ наблюдали уменьшение молекулярной массы до 80 кДа, что подтверждало гликозилирование фитазы.

Таким образом, нами проведено выделение и очистка бактериальной фитазы agpP из культуральной жидкости рекомбинантных дрожжей *Pichia pastoris*. Дальнейшее изучение физико-химических, биохимических и энзиматических свойств фермента позволит оценить возможность его использования в качестве кормовых добавок.

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РФФИ № 16-16-04062.