****

**ВВЕДЕНИЕ**

Фосфор – один из основных макроэлеменов клетки, жизненно необходимый для ее нормального функционирования. Играя немаловажную роль во многих обменных, энергетических и регуляторных процессах, фосфор входит в состав нуклеиновых кислот, фосфолипидов, коферментов, макроэргических молекул, ферментных белков и гормонов [Мухаметзянова с соавт.,2012].

Фитат, или фитиновая кислота, представляет собой основную форму хранения фосфора в кормах растительного происхождения, таких как зерновые, бобовые и масличные культуры [Rao *et al.*,2009]. Соединения подобного рода не только практически не гидролизуются в процессе прохождения по кишечному тракту животных с однокамерным желудком ввиду очень низкой выработки специфических ферментов, вдобавок, они имеют свойство связываться с ионами двухвалентных металлов (Ca2+, Mg2+, Zn2+, Fe2+, Mn2+, Cu2+), положительно заряженными белками и аминокислотами с образованием нерастворимых комплексов [Kies *et al*.,2006]. Следовательно, корм таких животных должен быть насыщен большим количеством неорганического фосфора, чтобы удовлетворить потребность организма в этом макроэлементе. Однако увеличение количества неорганического фосфора в кормах ведет к повышению содержания неусвоенного фитинового фосфора в навозе животных, что приводит к фосфатному загрязнению окружающей среды и эвтрофикации [Xiong *et al*., 2005; Ngata, Taylor,2018].

Перспективной стратегией в решении данной проблемы является добавление в корма животных специфических микробных ферментов – фитаз, расщепляющих фитат до спирта инозитола и свободных фосфатов. В свою очередь, это направление дает толчок для создания гетерологичных систем экспрессии на основе фитаз, позволяющих получить достаточное количество фермента, необходимого для изучения его биохимических и энзиматических свойств и дальнейшего практического применения.

Метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris*  вместе с дрожжевыми векторами представляют собой большой интерес в качестве высокоэффективной системы экспрессии гетерологичных белков, обеспечивающей высокий уровень продукции за счет сильных и регулируемых промоторов. Дрожжевая культура способна достигать высокой плотности клеток и синтезировать рекомбинантные белки не только внутриклеточно, но и наружно, значительно упрощая процесс очистки интересующего исследователей продукта.

Целью данной работы явилась оценка влияния сигнальных пептидов на секрецию бактериальной гистидиновой кислой фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 дрожжами *Pichia pastoris*.

В работе решались следующие задачи:

1. Получение рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris*, в геном которых интегрирован ген фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 (*agpP*) под контролем индуцибельного промотора AOX1 и сигнальных пептидов α-амилазы и α-фактора.
2. Анализ экспрессии и секреции бактериальной фитазы рекомбинантными штаммами *P. pastoris*.
3. Изучение влияния сигнальных пептидов на секрецию бактериальной фитазы.

## ВЫВОДЫ

1. Методом электропорации получены рекомбинантные штаммы *Pichia pastoris*, в геном которых интегрирован ген фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 (*agpP*) под контролем индуцибельного промотора AOX1 и сигнальных пептидов α-амилазы и α-фактора.
2. Результаты вестерн-блоттинга и анализа фитазной активности показали, что бактериальная фитаза AgpP экспрессируется на уровне трансляции и секретируется в культуральную жидкость рекомбинантными дрожжами *Pichia pastoris*.
3. По результатам сравнительного анализа фитазной активности и вестерн-блоттинга выявлен наиболее эффективный сигнальный пептид экспрессионной системы – SP инулиназы.