

ДЕТОКСИЦИРУЮЩИЕ АФЛАТОКСИН В1 И ЗЕАРАЛЕНОН РЕКОМБИНАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ КАК ИННОВАЦИОННЫЕ СРЕДСТВА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕКОНТАМИНАЦИИ ЗЕРНОВЫХ КОРМОВ

Л.А. Щербакова, И.Г. Синельников, И.Н. Зоров

Всероссийский НИИ фитопатологии РАН, Россия, 143050, Московская обл., Большие Вяземы, ВНИИФ, владение 5

e-mail: larisavniif@yahoo.com

Удовлетворяющие современным требованиям качество и безопасность продукции растениеводства имеют первостепенное значение для востребованности ее на мировом и национальном рынках. Однако, контаминация этой продукции, в том числе фуражного зерна, опасными для теплокровных микотоксинами, в частности афлатоксином В1 (АФВ1) и зеараленоном (ЗЕА) критически снижает конкурентоспособность зерновых кормов. В связи с широким распространением в природе видов *Aspergillus* и *Fusarium*, продуцирующих, соответственно, АФВ1 и ЗЕА, и способностью этих грибов развиваться на кормах во время хранения проблема микотоксинового загрязнения имеет глобальной характер. Применение существующих способов деконтаминации зерновых кормов часто ограничено либо из-за их недостаточной эффективности или негативного воздействия на обрабатываемую продукцию, либо в связи с высокими энергозатратами и стоимостью обработок. Создание деконтаминационных препаратов на основе рекомбинантных токсин-деградирующих ферментов, полученных с помощью их гетерологической экспрессии в легко культивируемых и высокопроизводительных микробных продуцентах – инновационный подход, позволяющий обеспечить кормовую безопасность фуражного зерна, одновременно сохраняя его питательную ценность.

Данный подход был использован нами для получения рекомбинантных АФВ1-оксидазы (гАFO) опенка дубового (*Armillaria tabescens*) в клетках дрожжей *Pichia pastoris* (штамм GS115) и ЗЕА-гидролазы (гZHD) из аскомицета *Clonostachys rosea* в культуре штамма РСА-10 гриба *Penicillium canescens*. Для интродукции генов, кодирующих АФВ1-оксидазы (*afo*)

и ЗЕА-гидролазы (*zhd101*) в геномы соответствующих реципиентных штаммов были сконструированы плазмидные векторы рPIGA-*afo* и рXEG-ZHD, содержавшие промоторную последовательность гена алкогольоксидазы АОХ1 (в случае рPIGA-*afo*) или ксиланазы ху1А (в случае рXEG-ZHD). После подтверждения корректности вставок *adtz* и *zhd101* (ПЦР и секвенирование по Сенгеру) и последующей идентификации гАFO и гZHD в секрете трансформированных штаммов методами ДСН-ПААГ ЭФ и MALDI-TOF MS, рекомбинантные ферменты были выделены из культуральной жидкости наиболее продуктивных клонов и очищены до гомогенного состояния с помощью металло-хелатной хроматографии. Полученные ферментные препараты были использованы для обработки образцов зерна пшеницы и кукурузы, инокулированного токсигенными *A. flavus* или *F. culmorum*. Во всех экспериментах обработка зараженных образцов препаратами рекомбинантных ферментов при оптимальных для их целевой активности 30°C и значениях pH (6,0 для гАFO и 8,5 для гZHD) приводила к достоверному снижению загрязненности зерна микотоксинами. Так, ВЭЖХ-анализы экстрактов контаминированного зерна показали, что через 72 часа после его обработки гАFO содержание АФВ1 в образцах не превышало допустимых для фуражного зерна норм, установленных правилами безопасности Таможенного Союза, а обработка зерна препаратом гZHD приводила к его полной очистке от ЗЕА уже через 48 часов. Эти данные свидетельствуют о перспективности разработки средств деконтаминации кормов на основе рекомбинантных ферментов.

Исследования поддержаны Российским научным фондом (проект РФФ №22-16-00153).