

ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОЙ α -АМИЛАЗЫ ИЗ *BACILLUS PARALICHENIFORMIS*

Попова В.С.^{1,2}, Кирибаева А.К.¹, Хасенов Б.Б.^{1*}

¹Национальный центр биотехнологии, Кургальжинское шоссе, 13/5, г. Астана, 010000, Казахстан.

²Евразийский Национальный Университет им. Л. Гумилева, К.Сатпаева, 2, г. Астана, 010000, Казахстан.

*Корреспондент автор: Хасенов Б.Б., khassenov@biocenter.kz.

АБСТРАКТ

В настоящем исследовании успешно клонирована, экспрессирована в клетках *Escherichia coli* и очищена α -амилаза из казахстанского штамма *Bacillus paralicheniformis*, обладающего высокой амилолитической активностью. Ген α -амилазы был амплифицирован методом полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров, подобранных на основе данных полногеномного секвенирования штамма *B. paralicheniformis* T7 (GenBank accession # CP124861). Ген был клонирован в векторе pET-28c(+) и с помощью плазмидной экспрессии была получена рекомбинантная α -амилаза. С использованием металлоаффинной хроматографии был очищен рекомбинантный белок, выход которого составил 1,26 мг/л. Рекомбинантная α -амилаза обладает максимальной активностью при 85°C и устойчива к часовой инкубации при 70°C и 80°C. Оптимальное значение pH для рекомбинантного фермента составляет 6,0. Удельная активность рекомбинантной α -амилазы в оптимальных условиях составляет 2512.6 ± 54.7 Ед/мг. Ионы Ca^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} в 1,5-2 раза увеличивают, а ионы Fe^{3+} на 90% уменьшают активность рекомбинантной α -амилазы. Основными продуктами гидролиза картофельного крахмала при использовании рекомбинантной α -амилазы выступают: глюкоза, мальтоза, мальтотреоза, мальтотетраоза и мальтопентаоза. В целом, результаты свидетельствуют о высоком потенциале использования α -амилазы из *B. paralicheniformis* в переработке крахмала и крахмалсодержащего сырья.

Ключевые слова: α -амилаза, крахмал, рекомбинантный фермент, *Bacillus paralicheniformis*.

1. ВВЕДЕНИЕ

Современная индустрия используя микроорганизмы в качестве продуцентов промышленных ферментов значительно увеличила их производство благодаря развитию биотехнологии [1]. Ферменты амилолитического комплекса занимают почти треть рынка ферментов и α -амилазы являются одними из самых востребованных ферментов [2]. α -Амилаза (диастаза, α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза; КФ 3.2.1.1) является ферментом, осуществляющим гидролитическое расщепление полисахаридов: крахмала, гликогена и других продуктов, содержащих три и более остатков глюкозы [3]. Амилаза катализирует расщепление длинноцепочечных углеводов с образованием мальтотриозы, мальтозы, глюкозы и декстрина в качестве конечных продуктов [4].

Амилолитические ферменты получают из различных источников, включая растения, животные и микроорганизмы [5]. Из них наиболее широко используемые в промышленности являются ферменты микробного происхождения [6]. Основными продуцентами амилаз выступают бактерии – *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *Pseudoalteromonas* sp. и микроскопические грибы – *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. awamori*, *A. fumigatus*, *A. favus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor* sp. [7, 8]. Амилазы микробного происхождения характеризуются устойчивостью к высоким температурам, активны при значениях pH, близких к нейтральным, и в основном являются металлоферментами, которым для стабилизации их конформационной структуры и активности требуются ионы кальция [9].

Фермент α -амилаза используется в отраслях промышленности, производственные процессы которых зависят от крахмала [10]. Бактериальные α -амилазы применяют в пищевой, текстильной и бумажной промышленности, известны штаммы *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* и *B. amyloliquefaciens*, которые являются продуцентами термостабильной α -амилазы [8]. Для α -амилаз полученных с использованием данных штаммов оптимальное значение pH лежит в диапазоне от 6,0 до 7,0, а температура при которой их активность имеет максимальное значение активности варьируется от 50°C до 80°C [9].

Ферментативный гидролиз крахмала и крахмалсодержащего сырья требует использование термостабильных ферментов, в связи с чем возникает постоянный поиск новых α -амилаз, устойчивых к воздействию высоких температур. В настоящей работе приведены результаты по изучению биохимических параметров новой α -амилазы, полученной рекомбинантным способом путем клонирования и экспрессии гена из казахстанского штамма *Bacillus paralicheniformis* в клетках *Escherichia coli*.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Штаммы, вектора, олигонуклеотиды

В работе использовали штамм *B. paralicheniformis* из лабораторной коллекции Национального центра биотехнологии с выраженной амилазной активностью и депонированный в коллекции микроорганизмов Национального центра биотехнологии за номером В-NCB 0704. Для сборки генно-инженерной конструкции и размножения плазмиды использовался штамм *Escherichia coli* DH5 α , в

качестве экспрессионного штамма использовался штамм *Escherichia coli* Arctic Express RP(DE3).

Для плазмидной экспрессии генов был использован вектор pET-28c(+) (Novogen, USA). Для клонирования гена α -амилазы использовались олигонуклеотиды, синтезированные в компании LumiProbe (Россия): AmF (5'-GG AATCCATATGGCAAATCTTAATGGGACGCTG-3') и AmR (5'-TTTCTTTTTCGCGCCGCTCTTTGAACATAG ATCGAAACCGAT-3').

Для отбора позитивных клонов методом ПЦР-скрининга и секвенирования вставки использовалась пара коммерческих праймеров T7fw (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') и T7rv (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3').

2.2 Реактивы, питательные среды

В работе использовались реактивы производства Sigma (St. Louis, MO, USA) и AppliChem (Darmstadt, Germany). Для культивирования штамма *B. paralicheniformis* использовался питательный бульон (0,5% пептона, 0,5% NaCl, 0,15% дрожжевого экстракта, 0,15% мясного экстракта, pH 7,4). Для культивирования штаммов *E. coli* DH5 α и ArcticExpressRP(DE3) использовали бульон Луриа-Бертани (1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% NaCl, pH 7,5) и агар на основе бульона Луриа-Бертани (1,5% агара, 1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% NaCl, pH 7,5). Для отбора клонов-трансформантов использовали антибиотик канамицин в концентрации 50 мкг/мл.

2.3 Клонирование гена α -амилазы

Культивирование штамма *B. paralicheniformis* проводили на питательном бульоне в объеме 5 мл при 37°C в шейкере-инкубаторе при 180 об/мин в течение 16 часов. Клетки собирали центрифугированием при 6000 \times g, в течение 7 минут при 4°C. Выделение геномной ДНК из клеток *B. paralicheniformis* проводили с использованием набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA).

Ген α -амилазы был амплифицирован из геномной ДНК штамма *B. paralicheniformis* с помощью олигонуклеотидов AmF и AmR, соответственно. Состав ПЦР: 100 нг геномной ДНК, 5X Phusion HF буфер, 2,5 мМ смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 10 мкМ каждого олигонуклеотида, 1,25 Ед Phusion ДНК полимеразы и 15,5 мкл безнуклеазной воды. Условия ПЦР: цикл 98°C в течение 3 мин; 25 циклов - 98°C в течение 30 секунд, 57°C в течение 45 секунд, 72°C в течение 45 секунд; 1 цикл - 72°C в течение 10 минут. Очистку амплифицированных генов от компонентов реакционной смеси проводили с помощью хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом. Амплифицированный ген α -амилазы и вектор pET-28c(+) обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NdeI (Thermo Scientific, USA) и NotI (Thermo Scientific) в буфере O (Thermo Scientific) в течение 2,5 часов в водяной бане при 37°C. Гидролизованые фрагменты ДНК очищали хлороформной экстракцией и лигировали с использованием T4 ДНК Лигазы (Thermo Scientific) в течение 16 часов при 4°C. Полученной лигазной смесью обрабатывали компетентные клетки DH5 α по протоколу температурного шока. Отбор положительных клонов проводили

на ЛБ-агаре с канамицином. Клоны-трансформанты подвергали ПЦР-скринингу, позитивные клоны нарабатывали и выделяли плазмидную ДНК с использованием набора Monarch Plasmid Miniprep (New England Biolabs, USA). Вставку в плазмидную ДНК секвенировали с использованием праймеров T7fw и T7rv.

2.4 Экспрессия гена амилазы в клетках *Escherichia coli* и хроматографическая очистка рекомбинантной α -амилазы

Полученной генно-инженерной конструкцией были трансформированы компетентные клетки ArcticExpressRP(DE3) методом электропорации. Трансформацию проводили с использованием электропоратора MicroPulser (BioRad, США). Использовалось 87 нг очищенной плазмидной ДНК и 50 мкл клеточной суспензии. Время переноса составило 4 мкс. Отбор клонов-трансформантов проводили на ЛБ-агаре с канамицином. Единичную культуру каждого рекомбинантного штамма культивировали в ЛБ-бульоне в объеме 200 мл при 37°C, в течение 3 часов и встряхивании 200 об/мин. В середине логарифмической фазы роста при OD₆₀₀ = 0,6 добавляли 0,5 мМ изопропил- β -D-тиогаляктопиранозид (ИПТГ) и инкубировали в течение 16 часов при 30°C и встряхивании 150 об/мин. Клетки в образцах лизировали ультразвуком и анализировали в ПААГ-ДСН электрофорезе.

Проводили наработку и индукцию рекомбинантных штаммов в объеме 1 л. Клеточную массу собирали центрифугированием при 6000 \times g, 7 минут, 4°C, суспендировали в 20 мМ Tris-HCl, (pH 7.0) с 20 мМ NaCl, добавляли фенолметилсульфонил фторид (ФМСФ) в конечной концентрации 1 мМ и лизировали с помощью лизоцима в концентрации 2 мг/мл с дополнительным соникированием. Лизат осветляли центрифугированием при 18000 \times g, 60 минут, 4°C. Надосадочную жидкость прогревали при 60 °C в течение 30 минут. Осветленный лизат наносили на агарозную колонку Ni-NTA (Invitrogen, USA), предварительно уравновешенную суспендирующим буфером. Рекомбинантный белок элюировали ступенчатым градиентом по имидазолу 20-500 мМ в 20 мМ Tris-HCl (pH 7.0) с 500 мМ NaCl. Анализ фракций в элюатах проводили электрофорезом в ПААГ-ДСН.

2.5 Определение α -амилазной активности

Определение α -амилазной активности проводили по методу редуцирующих сахаров в соответствии с [11, 12]. Крахмал (Sigma-Aldrich) растворяли в 100 мМ фосфатном буфере (pH 6,0) для приготовления 1% (мас./об.) раствора, который служил субстратом. 980 мл субстрата инкубировали в течение 10 мин с 20 мкл разведенного фермента. Затем к реакционной смеси добавляли 1,5 мл реагента 3,5-динитросалициловой кислоты (ДНСК). Смесью кипятили на водяной бане 10 минут. Поглощение измеряли на спектрофотометре UV-1900i (Shimadzu, Japan) на длине волны 540 нм. Калибровочную кривую строили с использованием глюкозы (Sigma-Aldrich) в качестве стандарта. Одна единица активности α -амилазы соответствовала количеству фермента, выделяющему 1 мкмоль восстанавливающей глюкозы за 1 минуту. Измерения проводились в трех экземплярах, и среднее значение трех повторов указывается как окончательный результат.

2.6 Определение активности рекомбинантной α -амилазы от pH и температуры и ионов металлов

Зависимость активности α -амилазы от pH определяли в диапазоне pH от 4,0 до 11,0. Температурную зависимость ферментативной активности определяли в диапазоне температур 20–100°C в 100 мМ фосфатном буфере (pH 6,0). Максимальную ферментативную активность принимали за 100% активности, а результаты, полученные при различных уровнях pH и температурах, оценивали в процентах от максимума. Влияние температуры на стабильность фермента определяли путем предварительной инкубации при 70°C, 80°C и 90°C в оптимальном буфере в течение 1 часа. Активность α -амилазы определялась при температуре 85°C и pH 6,0. Начальная ферментативная активность была установлена на уровне 100%, а остаточная активность рассчитывалась относительно начальной в процентах. Были использованы следующие буферные системы: 100 мМ буфер ацетата натрия (pH 4,0–5,0), 100 мМ фосфатный буфер (pH 6,0–8,0) и 100 мМ глицин-NaOH (pH 9,0–11,0).

Влияние ионов металлов на активность α -амилазы определялось в присутствии одного из четырех хлоридов: CaCl_2 , CuCl_2 , CoCl_2 и FeCl_3 , которые использовались в концентрации 10 мМ. Фермент предварительно инкубировали с исследуемым веществом при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего измеряли активность в оптимальных условиях. Ферментативная активность без предварительной инкубации с ионами металлов, была установлена на уровне 100%, а остаточная активность рассчитывалась в процентном отношении от исходной активности. Измерения проводились в трех повторениях, и среднее значение трех повторов приводится как окончательный результат.

2.7 Определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [13] с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта. Вкратце, смешивали 100 мкл реагента Бредфорда (Bio-Rad, München, Germany) и 860 мкл 10% PBS с 1% глицерина и добавили 40 мкл образца белка. Смесь инкубировали 2 мин при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при 595 нм.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Клонирование гена α -амилазы и получение генно-инженерной конструкции

На основе анализа полного генома штамма *Bacillus paralicheniformis* были подобраны праймеры, специфичные к гену α -амилазы. Общая протяженность гена α -амилазы насчитывает 1538 п.о. Анализ последовательности гена показал, что первые 87 оснований кодируют пептид MKQHKRLYARLLPLLFALIFLLPHSAAAA, который обеспечивает внеклеточную секрецию α -амилазы штаммом *B. paralicheniformis*. С учетом этого, прямой праймер подбирался таким образом, чтобы удалить данный секреторный пептид. Дополнительно праймеры содержали сайты для эндонуклеаз рестрикции *NdeI* и *NotI*. С использованием указанных олигонуклеотидов был амплифицирован ген α -амилазы (рисунок 1), который был интегрирован в экспрессионный вектор pET-28c(+). Полная длина ампли-

фиката составляла 1409 п.о.

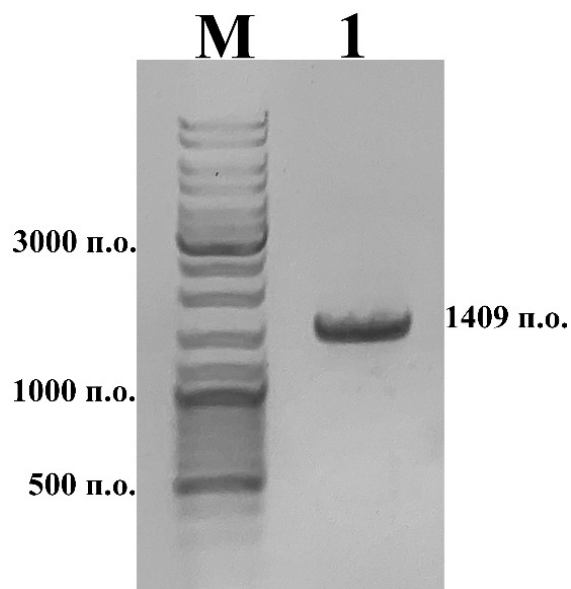


Рисунок 1 – ПЦР-амплификация гена α -амилазы из геномной ДНК *B. Paralicheniformis*. М – ДНК маркер (New England Biolabs, cat# N3200S); 1 – ген α -амилазы из *B. paralicheniformis*.

ПЦР скрининг показал наличие гена α -амилазы для клона №7 (рисунок 2). Данный клон нарабатывали в ЛБ-бульоне, выделяли плазмидную ДНК по протоколу Miniprep и подвергали секвенированию по T7 региону с использованием праймеров T7fw и T7rv. Секвенирование подтвердило соответствие последовательности встроенного гена последовательности α -амилазы из генома *B. paralicheniformis* T7 без каких-либо мутаций. В результате получена генно-инженерная конструкция pET-28c/amy, в которой ген α -амилазы встроен под контроль промотора РНК полимеразы бактериофага T7. В открытой рамке считывания белок содержит гексагистидиновые метки с N-и C конца и насчитывают 515 аминокислотных остатка. Расчетная масса рекомбинантного белка составляет 58,8 кДа.

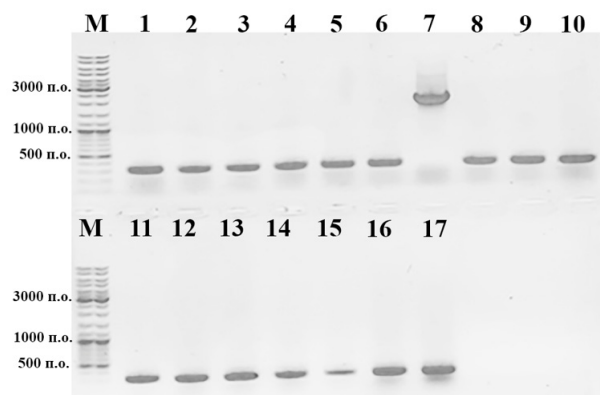


Рисунок 2 – Результаты ПЦР-скрининга клонов. М – ДНК маркер (New England Biolabs, cat# N3200S); 1-17 –

3.2 Выделение и хроматографическая очистка рекомбинантной α -амилазы

Путем трансформации клеток *E. coli* штамма

ArcticExpressRP(DE3) вектором с геном α -амилазы получен рекомбинантный штамм. Проверка экспрессии гена α -амилазы показала, что рекомбинантный штамм при добавлении 0,5 мМ ИПТГ эффективно экспрессировал ген α -амилазы на протяжении всего периода индукции. Из результатов следует, что в клетках штамма наблюдается линейное накопление рекомбинантной α -амилазы.

Рекомбинантная α -амилаза содержит две гексагистидиновые метки, которые позволяют проводить очистку рекомбинантных белков методом металлоаффинной хроматографии, основанной на аффинности имидазольного кольца остатков гистидина к ионам двухзарядным металлам. Проведенная металлоаффинная очистка с использованием Ni-NTA агарозы позволила получить чистые фракции α -амилазы (рисунок 3).

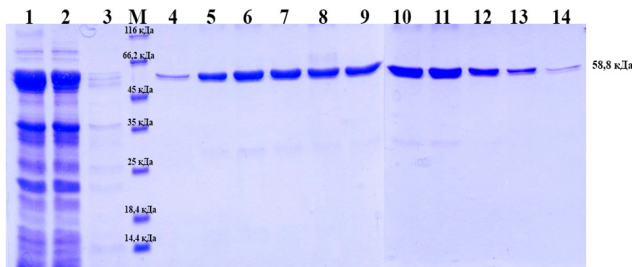


Рисунок 3 – Результаты хроматографической очистки рекомбинантной α -амилазы из индуцированной культуры ArcticExpressRP(DE3)/pET-28/amy. М – белковый маркер (Thermo Scientific cat#26610); 1- лизат до нанесения на колонку; 2- лизат после колонки; 3- фракция, элюированная 20 мМ имидазолом; 4- фракция, элюированная 50 мМ имидазолом; 5,6- фракции, элюированные 100 мМ имидазолом; 7-10 – фракции, элюированные 150 мМ имидазолом; 11-14 – фракции, элюированные 500 мМ имидазолом.

Фракции 5-12 были объединены и диализованы. Определение концентрации белка по методу Бредфорда показало, что выход очищенной и детализованной рекомбинантной α -амилазы составляет 1,26 мг с 1 литра культуры *E. coli*. Измерение активности показало, что удельная активность рекомбинантной α -амилазы составляет $2512,6 \pm 54,7$ Ед/мг.

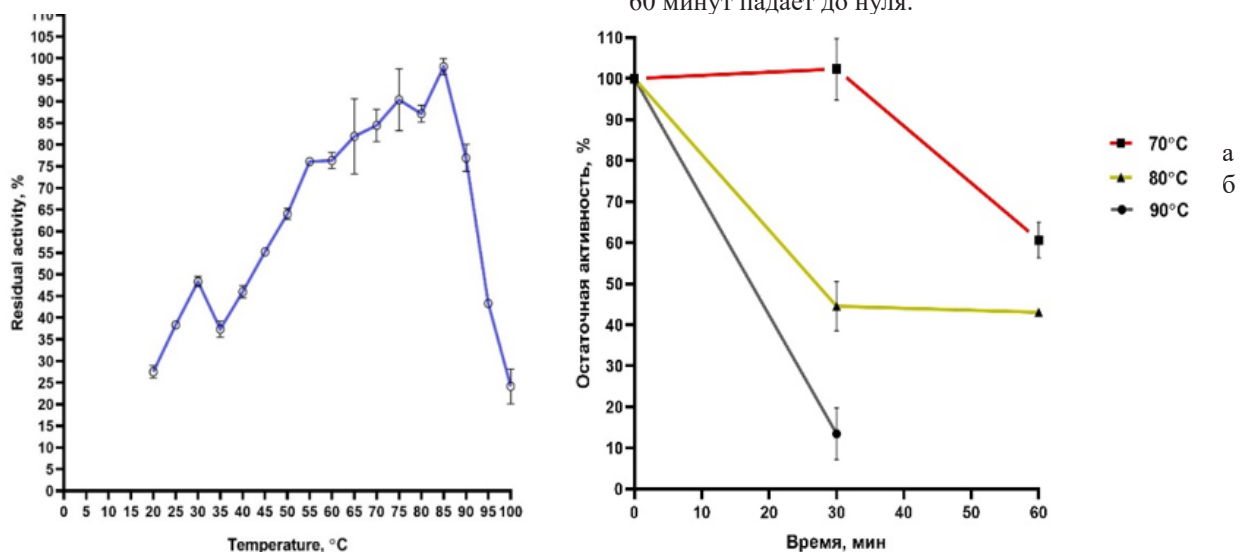


Рисунок 5 – Влияние температуры на активность (а) и на стабильность (б) рекомбинантной α -амилазы.

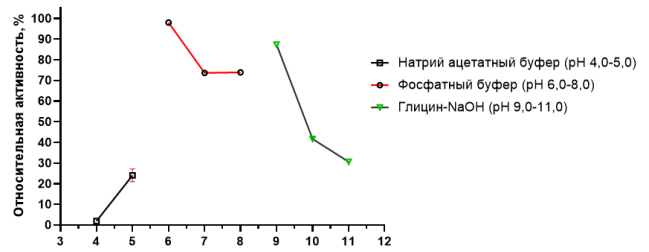


Рисунок 4 – Влияние pH на активность рекомбинантной α -амилазы.

3.3 Определение биохимических параметров рекомбинантной α -амилазы

Изучение зависимости α -амилазной активности рекомбинантного фермента от pH в диапазоне от 4 до 11 показало, что максимальную активность фермент демонстрирует при pH 6,0 (рисунок 4). В диапазоне от 9 до 11 активность снижается с 87,9% до 33,0%. При значениях pH 4,0 и 5,0 активность α -амилазы составляет 2,3% и 26,9% соответственно.

Исследования показали, что рекомбинантная α -амилаза демонстрирует высокую активность при повышенных температурах, как видно из графика (рисунок 4а). Рекомбинантная α -амилаза проявляет значительную активность, превышающую 60% от максимальной, уже при температуре 50°C. Максимальную активность фермент демонстрирует при 85°C. При дальнейшем повышении температуры до 90°C активность α -амилазы сохраняется на уровне 78,9%, а при 100°C снижается до 28% от максимального значения. Исследование термостабильности рекомбинантной α -амилазы при температурах 70°C, 80°C и 90°C показало (рисунок 5), что фермент демонстрирует различную устойчивость к высоким температурам. При инкубации при 70°C в течение 60 минут остаточная активность рекомбинантной α -амилазы составила 60% от максимального значения. При инкубации 80°C фермент продемонстрировал быстрое снижение активности: за 30 минут инкубации активность составила 48%, а за 60 минут снизилась до 43%. При инкубации 90°C в течение 30 минут остаточная активность снижается до 14%, а через 60 минут падает до нуля.

Для промышленной переработки крахмала особый интерес представляют термостабильные α -амилазы, которые используются для осахаривания и разжижения крахмала при 70–80 °С. α -Амилазы с повышенной стабильностью рН в щелочном диапазоне рН (7,0–9,0) перспективны для использования в моющих средствах [14]. Известно, что среди бактериальных α -амилаз термостабильные и щелочные α -амилазы присутствуют в *B. licheniformis* и *B. amyloliquefaciens* и имеют максимальную активность при рН 6,0–9,0 [15-17]. В этом отношении, установленные характеристики α -амилазы из *B. paralicheniformis* позволяют отнести данный фермент к категории термостабильных ферментов.

α -Амилазы относятся к семейству GH13 гликозид-гидролаз [18] и являются кальций-зависимыми эндоферментами [19-21]. При изучении влияния ионов металлов на активность рекомбинантной α -амилазы из *B. paralicheniformis* установлено, что фермент обладает чувствительностью к ионам двух- и трехвалентных металлов. В присутствии 10 мМ ионов кобальта ферментативная активность рекомбинантной α -амилазы увеличивается более чем в два раза. Ионы меди и кальция также стимулируют активность ферментативная активность на 50%. Отмечено ингибирующее влияние 10 мМ ионов Fe^{3+} на активность рекомбинантной α -амилазы - наблюдается снижение активности фермента на 90%.

Таблица 1 – Влияние ионов металлов Co^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} и Fe^{3+} на α -амилазную активность рекомбинантной

Ионы металлов	Остаточная активность, %
Контроль	100 ± 1,6
Co^{2+}	214,1 ± 33,1
Cu^{2+}	146,0 ± 9,9
Ca^{2+}	150,1 ± 2,5
Fe^{3+}	10,9 ± 1,9

Ранее, положительный эффект ионов кобальта Co^{2+} ранее был описан для α -амилаз *B. licheniformis* [10] и *A. oryzae* [45]. Кроме α -амилазы из *B. paralicheniformis* ионы Fe^{3+} , являются сильными ингибиторами активности α -амилазы из *B. licheniformis* T5 [22]. Если ионы меты Cu^{2+} ингибируют амилазную активность фермента из *B. licheniformis* T5 [22], то для α -амилазы из *B. paralicheniformis* ионы меди наоборот увеличивают активность.

Изучение продуктов гидролиза картофельного крахмала в результате обработки субстрата рекомбинантной α -амилазы при температуре 50°C в фосфатном буфере с рН 6,0 в течение 5 часов показало, что крахмал гидролизует в течение первых 15 минут и преимущественными продуктами гидролиза наряду с мономером глюкозой выступают олигомеры, состоящие из 2, 3, 4, 5 молекул глюкозы.

Полученные результаты показывают, что α -амилаза из штамма *Bacillus paralicheniformis* обладает высокой удельной активностью, термостабильностью и чувствительностью к ионам металлов. Эти свойства делают ее пер-

спективным инструментом для использования в технологических процессах, связанных с гидролизом крахмала и крахмалсодержащего сырья.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании успешно клонирована, экспрессирована в клетках *E. coli* и очищена рекомбинантная α -амилаза из штамма *Bacillus paralicheniformis*. Выход очищенного рекомбинантного белка составил 1,26 мг с 1 литра индуцированной культуры. Изучение биохимических параметров рекомбинантной α -амилазы показало, что рекомбинантная α -амилаза обладает максимальной активностью при 85°C, сохраняет более 75% в диапазоне 55-90°C. Рекомбинантная α -амилаза устойчива к часовой инкубации при 70°C и 80°C. Оптимальное значение рН для рекомбинантного фермента составляет 6,0, α -амилаза ферментативно активна при рН 5,0-10,0. Удельная активности рекомбинантной α -амилазы в оптимальных условиях составляет 2512,6 ± 54,7 Ед/мг. Добавление 10 мМ ионов Ca^{2+} , Cu^{2+} Co^{2+} в 1,5-2 раза увеличивает активность рекомбинантной α -амилазы, в то время как ионы Fe^{3+} наоборот сильно ингибируют активность фермента. Изучение продуктов гидролиза картофельного крахмала показало, что основными продуктами гидролиза выступают: глюкоза, мальтоза, мальтотреоза, мальтотетраоза и мальтопентаоза. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования α -амилазы из *B. paralicheniformis* в технологии ферментативного гидролиза крахмала и крахмалсодержащего сырья.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данное исследование было профинансировано Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (Грант AP23488270).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Kirk, O., Borchert T.V., Fuglsang, C.C. Industrial enzyme applications // Current opinion in biotechnology. - 2002. - Vol. 13(4). - P. 345-51. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(02\)00328-2](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(02)00328-2).
- Gopinath, S.C., Anbu, P., Arshad, M. K., Lakshmi priya, T., Voon, C. H., Hashim, U., Chinni, S. V. Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production // BioMed research international. - 2017. - Vol. 2017. - P. 1272193. <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., & Chauhan, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective // Process Biochemistry. - 2003. - Vol. 38(11). - P. 1599-1616. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0).
- Jujvarapu, S.E., Dhagat, S. Evolutionary Trends in Industrial Production of α -amylase // Recent patents on biotechnology. - 2019. - Vol. 13(1). - P. 4-18. <https://doi.org/10.2174/2211550107666180816093436>.
- Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A. 1 - α -Amylases // Current Developments in Biotechnology and Bioengineer-

- ing. - 2017. - P. 3-24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00001-4>
6. Zhang, Q., Han, Y., Xiao, H. Microbial α -amylase: A biomolecular overview // *Process Biochemistry*. - 2017. - Vol. 53. - P. 88-101. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.012>.
7. Elyasi Far, B., Ahmadi, Y., Yari Khosroshahi, A., Dilmaghani, A. Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives // *Advanced pharmaceutical bulletin*. - 2020. - Vol. 10(3). - P. 350-358. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.043>.
8. de Souza, P. M., de Oliveira Magalhães, P. Application of microbial α -amylase in industry - A review // *Brazilian Society for Microbiology*. - 2010. - Vol. 41(4). - P. 850-861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>.
9. Farias, T.C., Kawaguti, H.Y., Bello Koblitz., M.G. Microbial amylolytic enzymes in foods: Technological importance of the *Bacillus* genus // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. - 2021. - Vol. 35. - P. 102054. <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2021.102054>.
10. Läufer, A. Starch Biorefinery Enzymes // *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. - 2019. - Vol. 166. - P. 137-152. https://doi.org/10.1007/10_2016_60.
11. Pranay, K., Padmadeo, S.R., Prasad, B. Production of amylase from *Bacillus subtilis* sp. strain KR1 under solid state fermentation on different agrowastes // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. - 2019. - Vol. 21. - P. 101300. <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2019.101300>.
12. Zhang, K., Tan, R., Yao, D., Su, L., Xia, Y., & Wu, J. Enhanced Production of Soluble *Pyrococcus furiosus* alpha-Amylase in *Bacillus subtilis* through Chaperone Co-Expression, Heat Treatment and Fermentation Optimization // *Journal of microbiology and biotechnology*. - 2021. - Vol. 31(4). - P. 570-583. <https://doi.org/10.4014/jmb.2101.01039>.
13. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical biochemistry*. - 1976. - Vol. 72. - P. 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
14. Mehta, D., Satyanarayana, T. Bacterial and Archaeal alpha-Amylases: Diversity and Amelioration of the Desirable Characteristics for Industrial Applications // *Frontiers in microbiology*. - 2016. - Vol. 7. - P. 1129. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01129>.
15. Wu, X., Wang, Y., Tong, B., Chen, X., & Chen, J. Purification and biochemical characterization of a thermostable and acid-stable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* B4-423 // *International journal of biological macromolecules*. - 2018. - Vol. 109. - P. 329-337. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.004>.
16. Du, R., Song, Q., Zhang, Q., Zhao, F., Kim, R. C., Zhou, Z., & Han, Y. Purification and characterization of novel thermostable and Ca-independent alpha-amylase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BH072. *International journal of biological macromolecules*. - 2018. - Vol. 115. - P. 1151-1156. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.004>.
17. Afrisham, S., Badoei-Dalfard A, Namaki-Shoushtari A, Karami Z. Characterization of a thermostable, CaCl₂-activated and raw-starch hydrolyzing alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* AT70: Production under solid state fermentation by utilizing agricultural wastes // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. - 2016. - Vol. 132. - P. 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.07.002>.
18. Kumar, V. Identification of the sequence motif of glycoside hydrolase 13 family members // *Bioinformation*. - 2011. - Vol. 6(2). - P. 61-63. <https://doi.org/10.6026/97320630006061>.
19. Wang, Y.C., Wang, Y. C., Hu, H. F., Ma, J. W., Yan, Q. J., Liu, H. J., & Jiang, Z. Q. A novel high maltose-forming alpha-amylase from *Rhizomucor miehei* and its application in the food industry // *Food chemistry*. - 2020. - Vol. 305. - P. 125447. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125447>.
20. Janecek, S., Svensson, B., MacGregor, E.A. α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases // *Cellular and molecular life sciences*. - 2014. - Vol. 71(7). - P. 1149-1170. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1388-z>.
21. Mohamed, S.A., Al-Malki, A.L., Kumosani, T.A. Partial purification and characterization of five α -amylases from a wheat local variety (Balady) during germination // *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. - 2009. - Vol. 3(3). - P. 1740-1748.
22. Kiribayeva, A., Silayev, D., Akishev, Z., Baltin, K., Aktayeva, S., Ramankulov, Y., & Khassenov, B. An impact of N-glycosylation on biochemical properties of a recombinant α -amylase from *Bacillus licheniformis* // *Heliyon*. - 2024. - Vol. 10(6). - P. e28064. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28064>.

REFERENCES

1. Kirk, O., Borchert T.V., Fuglsang, C.C. Industrial enzyme applications // *Current opinion in biotechnology*. - 2002. - Vol. 13(4). - P. 345-51. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00328-2).
2. Gopinath, S.C., Anbu, P., Arshad, M. K., Lakshmi Priya, T., Voon, C. H., Hashim, U., Chinni, S. V. Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production // *BioMed research international*. - 2017. - Vol. 2017. - P. 1272193. <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>.
3. Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., & Chauhan, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective // *Process Biochemistry*. - 2003. - Vol. 38(11). - P. 1599-1616. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0).
4. Jujjavarapu, S.E., Dhagat, S. Evolutionary Trends in Industrial Production of α -amylase // *Recent patents on biotechnology*. - 2019. - Vol. 13(1). - P. 4-18. <https://doi.org/10.2174/2211550107666180816093436>.
5. Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A. 1 - α -Amylases // *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. - 2017. - P. 3-24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00001-4>
6. Zhang, Q., Han, Y., Xiao, H. Microbial α -amylase: A biomolecular overview // *Process Biochemistry*. - 2017. - Vol. 53. - P. 88-101. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.012>.
7. Elyasi Far, B., Ahmadi, Y., Yari Khosroshahi, A., Dilmaghani, A. Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives // *Advanced pharmaceu-*

tical bulletin. - 2020. - Vol. 10(3). - P. 350-358. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.043>.

8. de Souza, P. M., de Oliveira Magalhães, P. Application of microbial α -amylase in industry - A review // Brazilian Society for Microbiology. - 2010. - Vol. 41(4). - P. 850-861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>.

9. Farias, T.C., Kawaguti, H.Y., Bello Koblitz., M.G. Microbial amylolytic enzymes in foods: Technological importance of the Bacillus genus // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. - 2021. - Vol. 35. - P. 102054. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102054>.

10. Läufer, A. Starch Biorefinery Enzymes // Advances in biochemical engineering/biotechnology. - 2019. - Vol. 166. - P. 137-152. https://doi.org/10.1007/10_2016_60.

11. Pranay, K., Padmadeo, S.R., Prasad, B. Production of amylase from Bacillus subtilis sp. strain KR1 under solid state fermentation on different agrowastes // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. - 2019. - Vol. 21. - P. 101300. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101300>.

12. Zhang, K., Tan, R., Yao, D., Su, L., Xia, Y., & Wu, J. Enhanced Production of Soluble Pyrococcus furiosus alpha-Amylase in Bacillus subtilis through Chaperone Co-Expression, Heat Treatment and Fermentation Optimization // Journal of microbiology and biotechnology. - 2021. - Vol. 31(4). - P. 570-583. <https://doi.org/10.4014/jmb.2101.01039>.

13. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical biochemistry. - 1976. - Vol. 72. - P. 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.

14. Mehta, D., Satyanarayana, T. Bacterial and Archaeal alpha-Amylases: Diversity and Amelioration of the Desirable Characteristics for Industrial Applications // Frontiers in microbiology. - 2016. - Vol. 7. - P. 1129. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01129>.

15. Wu, X., Wang, Y., Tong, B., Chen, X., & Chen, J. Purification and biochemical characterization of a thermostable and acid-stable alpha-amylase from Bacillus licheniformis B4-423 // International journal of biological macromolecules. - 2018. - Vol. 109. - P. 329-337. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.004>.

16. Du, R., Song, Q., Zhang, Q., Zhao, F., Kim, R. C., Zhou, Z., & Han, Y. Purification and characterization of novel thermostable and Ca-independent alpha-amylase produced by Bacillus amyloliquefaciens BH072. International journal of biological macromolecules. - 2018. - Vol. 115. - P. 1151-1156. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.004>.

17. Afrisham, S., Badoei-Dalfard A, Namaki-Shoushtari A, Karami Z. Characterization of a thermostable, CaCl₂-activated and raw-starch hydrolyzing alpha-amylase from Bacillus licheniformis AT70: Production under solid state fermentation by utilizing agricultural wastes // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. - 2016. - Vol. 132. - P. 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.07.002>.

18. Kumar, V. Identification of the sequence motif of glycoside hydrolase 13 family members // Bioinformation. - 2011. - Vol. 6(2). - P. 61-63. <https://doi.org/10.6026/97320630006061>.

19. Wang, Y.C., Wang, Y. C., Hu, H. F., Ma, J. W., Yan, Q. J., Liu, H. J., & Jiang, Z. Q. A novel high maltose-forming alpha-amylase from Rhizomucor miehei and its application in the food industry // Food chemistry. - 2020. - Vol. 305. - P. 125447. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125447>.

20. Janecek, S., Svensson, B., MacGregor, E.A. α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases // Cellular and molecular life sciences. - 2014. - Vol. 71(7). - P. 1149-1170. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1388-z>.

21. Mohamed, S.A., Al-Malki, A.L., Kumosani, T.A. Partial purification and characterization of five α -amylases from a wheat local variety (Balady) during germination // Australian Journal of Basic and Applied Sciences. - 2009. - Vol. 3(3). - P. 1740-1748.

22. Kiribayeva, A., Silayev, D., Akishev, Z., Baltin, K., Aktayeva, S., Ramankulov, Y., & Khassenov, B. An impact of N-glycosylation on biochemical properties of a recombinant α -amylase from Bacillus licheniformis // Heliyon. - 2024. - Vol. 10(6). - P. e28064. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28064>.

UDC 577.1; 577.2; 579.6

OBTAINING AND STUDYING THE BIOCHEMICAL PROPERTIES OF RECOMBINANT α -AMYLASE FROM BACILLUS PARALICHENIFORMIS

Popova V.S.^{1,2}, Kiribaeva A.K.¹, Khassenov B.B.^{1*}

¹National Center for Biotechnology, Kurgalzhinskoe shosse, 13/5, Astana, 010000, Kazakhstan.

²Gumilyov Eurasian National University, K. Satpayev, 2, Astana, 010000, Kazakhstan.

*Corresponding Author: Khassenov B.B., khassenov@biocenter.kz.

ABSTRACT

In this study, α -amylase from a Kazakhstani strain of Bacillus paralicheniformis with high amylolytic activity was successfully cloned, expressed in Escherichia coli cells, and purified. The α -amylase gene was amplified by polymerase chain reaction using specific primers selected based on whole-genome sequencing data for the B. paralicheniformis T7 strain (GenBank accession # CP124861). The gene was cloned into the pET-28c(+) vector, and recombinant α -amylase was obtained using plasmid expression. The recombinant protein was purified using metal affinity chromatography, the yield of which was

1.26 mg/L. Recombinant α -amylase has maximum activity at 85°C and is resistant to hour-long incubation at 70°C and 80°C. The optimum pH value for the recombinant enzyme is 6.0. The specific activity of recombinant α -amylase under optimum conditions is 2512.6 ± 54.7 U/mg. Ca^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} ions increase the activity of recombinant α -amylase by 1.5-2 times, and Fe^{3+} ions decrease it by 90%. The main products of potato starch hydrolysis using recombinant α -amylase are: glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose and maltopentaose. Overall, the results indicate a high potential for the use of α -amylase from *B. paralicheniformis* in the processing of starch and starch-containing raw materials.

Key words: *α -amylase, starch, recombinant enzyme, Bacillus paralicheniformis.*

ӘОЖ 577.1; 577.2; 579.6

BACILLUS PARALICHENIFORMIS РЕКОМБИНАНТТЫ α -АМИЛАЗАНЫҢ БИОХИМИЯЛЫҚ ҚАСИЕТТЕРІН АНЫҚТАУ ЖӘНЕ ЗЕРТТЕУ

Попова В.С.^{1,2}, Кирибаева А.К.¹, Хасенов Б.Б.^{1*}

¹Ұлттық биотехнология орталығы, Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана, 010000, Қазақстан.

²Л. Гумилев Еуразия ұлттық университеті, Қ.Сәтбаев көшесі, 2, Астана, 010000, Қазақстан.

*Тілші автор: Хасенов Б.Б., khasenov@biocenter.kz.

АНДАПТА

Осы зерттеуде амилolitikалық белсенділігі жоғары отандық *Bacillus paralicheniformis* штаммынан алынған α -амилаза сәтті клондалып, ішек таяқшасының жасушаларында экспрессияланды және тазартылды. α -амилаза гені *B. paralicheniformis* штаммының T7 (GenBank қосылуы № CP124861) толық геномды секвенирлеу деректері негізінде таңдалған арнайы праймерлер арқылы полимеразды тізбекті реакция арқылы күшейтілді. Ген pET-28c(+) векторына клондалған және плазмидті экспрессия арқылы рекомбинантты α -амилаза өндірілген. Рекомбинантты ақуыз шығымы 1,26 мг/л болатын металға ұқсастық хроматографиясы арқылы тазартылды. Рекомбинантты α -амилаза 85 ° С температурада максималды белсенділікке ие және 70 ° С және 80 ° С температурада сағат сайын инкубацияға төзімділік танытты. Рекомбинантты фермент үшін оңтайлы рН мәні - 6,0. Оңтайлы жағдайларда рекомбинантты α -амилазаның меншікті белсенділігі $2512,6 \pm 54,7$ U/мг құрайды. Ca^{2+} , Cu^{2+} иондары Co^{2+} 1,5-2 есе арттырады, ал Fe^{3+} иондары рекомбинантты α -амилазаның белсенділігін 90%-ға төмендетеді. Рекомбинантты α -амилазаның көмегімен картоп крахмалы гидролизінің негізгі өнімдері: глюкоза, мальтоза, мальтотриоза, мальтотетраоза және мальтопентоза. Жалпы алғанда, алынған нәтижелер крахмал мен құрамында крахмал бар шикізатты өндеуде *B. paralicheniformis* α -амилазасын қолданудың жоғары тиімділігін көрсетеді.

Түйін сөздер: *α -амилаза, крахмал, рекомбинантты фермент, Bacillus paralicheniformis*