

УДК 577.15

ПОЛУЧЕНИЕ α -АМИЛАЗЫ *Bacillus amyloliquefaciens* В ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЕ *Bacillus mojavensis* И СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА

© 2024 г. В. Ю. Чиркова^{1, *}, Д. Н. Щербаков^{1, 2}, П. В. Колосов¹, М. В. Ширманов¹, Е. А. Колосова^{1, 2}, А. В. Малкова¹, Е. А. Шарлаева¹, А. Н. Иркитова¹, И. Ю. Евдокимов¹

¹Алтайский государственный университет, Барнаул, 656049 Россия

²ГНЦ Вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, Кольцово, 630559 Россия

*e-mail: varvara.chirkova@gmail.com

Поступила в редакцию 13.09.2023 г.

После доработки 22.11.2023 г.

Принята к публикации 13.12.2023 г.

Описаны условия получения рекомбинантной α -амилазы в безындукционной системе культивирования на основе *Bacillus mojavensis*. Проведена ферментация в опытно-промышленных ферментерах при глубинном культивировании, что обеспечило наработку опытных партий в количествах необходимых для проведения комплексных исследований полученных образцов. Постепенное накопление рекомбинантного фермента в биореакторе достигает максимума через 31 ч. Изучены некоторые биохимические параметры рекомбинантного фермента. Установлена его термостабильность и определен рН оптимум проявления активности – максимальная эффективность гидролиза субстрата наблюдалась при предварительном прогреве образца в течение 30 мин при температуре 55°C и рН равном 7.2. Выявлена обратно-пропорциональная зависимость между изменением уровня амилолитической активности и количеством хлорида кальция, вносимого при культивировании. Показана принципиальная возможность создания штаммов-продуцентов рекомбинантной α -амилазы на основе штамма *B. mojavensis* BDV-1.

Ключевые слова: *Bacillus mojavensis*, рекомбинантные ферменты, α -амилаза, культивирование, биореактор, ферментация, индукция, активность

DOI: 10.56304/S0234275824010034

Одним из широко используемых амилолитических ферментов является α -амилаза (КФ 3.2.1.1) – фермент класса гидролаз, расщепляющий α -1,4-гликозидные связи в полимерах крахмала [1]. α -Амилазы обнаружены у животных, в растениях и микроорганизмах. По сравнению с животными и растительными микробные амилазы имеют преимущество – они наиболее разнообразны по физико-химическим свойствам, что обуславливает широкие возможности их практического применения. α -Амилазы бактерий используются в производстве моющих средств, текстильной, бумажной и пищевой промышленности. Эти ферменты применяются в производстве мальтодекстрина, глюкозных и фруктозных сиропов, для осахаривания и перевода в жидкую фазу крахмала, осветления пива и фруктовых соков, для предобработки животного корма с целью повышения усвояемости, подготовки вязких, стабильных крахмальных

растворов, применяемых для разделения текстильных волокон и т.д. [2, 3].

Амилазы бактерий проявляют активность в достаточно широком диапазоне температур и рН, что обуславливает их использование для разработки продуцентов и получения рекомбинантных аналогов с улучшенными технологическими свойствами. Перспективными продуцентами амилолитических ферментов являются штаммы бактерий рода *Bacillus* [4]. Целью данной работы была проверка концепции использования синтетического промотора P_{gac} в формате вектора, не содержащего последовательность, кодирующую белок репрессор, для получения рекомбинантной α -амилазы в клетках *Bacillus mojavensis*, опытная наработка при глубинном культивировании в опытно-промышленных ферментерах рекомбинантного фермента и его частичная биохимическая характеристика.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы

Для проведения исследования был использован штамм-реципиент споровых бактерий *B. mojavensis* RCAM05968 BDV-1, с нокаутированными генами внеклеточных протеаз NprE, AprE, Epr, Vpr, Mpr, NprB, Vpr, WprA, депонированный под регистрационным номером RCAM05968 в качестве штамма-реципиента в 2022 г в ВКСМ (Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ФГБНУ ВНИИСХМ). Для данной культуры характерны плоские округлые кремовые колонии, 3–4 мм в диаметре. Интенсивность окрашивания неровного края колонии меньше, чем в центре. На основе указанного штамма получали штаммы, способные к продукции α -амилазы без добавления и с добавлением индуктора.

Получение генетических конструкций

Выбор α -амилазы *Bacillus amyloliquefaciens* в качестве объекта для исследования был продиктован рядом параметров, которые характерны для этой α -амилазы, в частности термостабильность и устойчивость в щелочных средах.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая α -амилазу *B. amyloliquefaciens*, была взята из базы данных GenBank (J01542.1). Для обеспечения высокого и стабильного выхода целевого продукта провели оптимизацию кодонного состава под систему экспрессии штамма *B. subtilis* на сервере ThermoFisher (<https://www.thermofisher.com/>). Процесс оптимизации нуклеотидного состава позволил учесть частоту встречаемости кодонов в организме *B. mojavensis*, а с другой стороны избежать присутствия различных негативных структурных элементов. После оптимизации был проведен анализ различия частот использования кодонов, а также негативных элементов с помощью серверов GenScript (<https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis>) и EFM Calculator (<http://barricklab.org/django/efm/>). Индекс Кодонной Адаптации (CAI) гена составил 0.93 (CAI = 1.0 считается идеальным).

Оптимизированная нуклеотидная последовательность гена α -амилазы AmyQ была синтезирована на автоматическом синтезаторе ABI 3400 DNA/RNA Synthesizer (“ДНКсинтез”, Россия).

Синтезированный ген был клонирован в составе вектора pGH (“ДНКсинтез”). ДНК pGH-AmyQ служила матрицей для амплификации последовательности гена AmyQ и встройки в плазмиду pHT255. Для ПЦР-амплификации использовали праймеры AmyQ-F (5'-AAAAAGGATCCATGATCAAAAACGAAAGCGGACA-3') и AmyQ-R (5'-CCCCGGGGACGTCTTATTTTC-3'). ПЦР-продукт выделяли при помощи набора для выделения ДНК Cleanup S-Cap (“Евроген”, Россия). Полученный

продукт, а также плазмиду pHT255 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BamHI и XbaI (“СибЭнзайм”, Россия). Продукты гидролиза очищали и лигировали. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* штамма NEB Stable (New England Biolabs, США). Отбор клонов проводили при помощи ПЦР.

Плазмиду pBSU-AmyQ получали удалением последовательности, кодирующей белок репрессора LacI, из плазмиды pHT255-AmyQ. Для этого последнюю обрабатывали эндонуклеазами BstNI и EqrI (“СибЭнзайм”). Полосу, соответствующую последовательности вектора (8332 п. н.) без последовательности гена белка репрессора, вырезали и очищали при помощи набора для выделения ДНК Cleanup S-Cap (“Евроген”). Затем проводили реакцию лигирования. Продуктами лигазной реакции трансформировали клетки *E. coli* штамма NEB Stable. Отбор клонов проводили при помощи ПЦР.

Структуру полученных плазмид подтверждали секвенированием по методу Сэнгера в ЦКП “Геномика” СО РАН (Новосибирск, Россия). При проведении анализа использовали набор SEQ2000 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit и 16-капиллярный автоматический секвенатор ABI 3130x1 (Applied Biosystems, США).

Питательные среды и условия культивирования

Пептон, дрожжевой экстракт, изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) были получены от компании “Диа-М” (Россия). Меласса, кукурузный экстракт и агар Эндо приобретены в “АлтайМед” (Россия), соли и другие реагенты от фирмы “Химмед” (Россия). Все реактивы отечественного производства имели квалификацию “х. ч.” и “ч. д. а.”.

Для определения численности живых бактерий использовали метод десятикратных разведений с высевом на L-агар (Лурия) следующего состава, г/л: дрожжевой экстракт – 5.0; пептон – 15.0; NaCl – 5.0; агар – 15.0; вода – до 1.0 л. Для экспериментального глубинного культивирования в условиях колб использовали три среды, две промышленных: меласно-кукурузная (г/л: меласса – 25; кукурузный экстракт – 12.5; MgSO₄ – 0.25; MnSO₄ – 0.03; CaCl₂ – 1; CoCl₂ – 0.046; FeSO₄ – 0.1; CuSO₄ – 0.1; дистиллированная вода – до 1.0 л) и меласно-кукурузная обогащенная (г/л: меласса – 25; дрожжевой экстракт – 1; пептон – 0.5; кукурузный экстракт – 12.5; MgSO₄ – 0.25; MnSO₄ – 0.03; CaCl₂ – 1; CoCl₂ – 0.046; FeSO₄ – 0.1; CuSO₄ – 0.1; дистиллированная вода – до 1.0 л), а также исследовательская питательная среда YTx2 (г/л: пептон – 16, дрожжевой экстракт – 10, NaCl – 5, дистиллированная вода – до 1.0 литра).

В L-агар и среду YTx2 добавляли хлорамфеникол до итоговой концентрации в среде 0.01 мкг/мл.

Агар Эндо использовали для проверки наличия в пробах энтеробактерий: 100 мкл образца без разведения распределяли на поверхности питательной среды с помощью шпателя Дригальского. Чашки культивировали в термостате при 37°C в течение 24 ч. Заключение о чистоте проб делали в случае отсутствия роста колоний в опытных чашках.

При культивировании штаммов, трансформированных плазмидой pHT255-AmyQ, в качестве индуктора использовали 1 mM раствор ИПТГ (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид, Glentham life sciences, Великобритания), который добавляли в колбы из расчета 50 мкл/50 мл среды при достижении культурой значения пропускания (Т) 0.6–0.8 (при λ = 600 нм).

На первом этапе все варианты продуцентов культивировали глубинно в колбах Эрленмейера объемом 100 мл с загрузкой среды 50 мл в шейкере-инкубаторе “Innova 44” (New Brunswick, США) при 37°C и 220 об./мин. в течение 24–48 ч. Ежедневно отбирали пробы, в которых определяли амилолитическую активность.

Опытно-промышленное культивирование штамма *B. mojavensis* с плазмидой pBSU-AmyQ проводили в ферментере (ООО “Сторге”, Россия) периодического действия вместимостью 15 л, оснащенный механической мешалкой и системами автоматической термо- и pH-регуляции и барботирования.

Для получения посевного материала культуру штамма-продуцента глубинно засеивали в колбы Эрленмейера объемом 500 мл с загрузкой питательной среды 150 мл (УТх2). Выращивание маточной культуры в шейкере-инкубаторе осуществляли при 37°C и 220 об./мин. в течение 24 ч. Определенные численности микроорганизмов осуществляли методом поверхностного посева на твердые среды с последующим инкубированием в термостате “Binder BD 115” (BINDER, Германия) при 37°C в течение 24 ч.

Глубинное культивирование штамма, трансформированного pBSU-AmyQ, проводили в био-реакторе. В качестве основной питательной среды в ферментере была использована также среда УТх2, в которую дополнительно вносили пеногаситель (лапрол) в количестве 1 мл/л. Посевной материал дозой 10% переносили в ферментер путем закалывания через посевной штуцер. После посева температуру среды поддерживали на уровне 37 ± 1°C, контролировали уровень растворенного кислорода. При уровне кислорода ниже 50% в ферментер непрерывно подавали стерильный воздух в количестве 0.5 л/мин на 1 л среды и поддерживали избыточное давление 0.02–0.03 МПа, перемешивание вели механической разноуровневой мешалкой со скоростью вращения 250–500 об./мин. Каждые 2 ч производили отбор проб для проведения наблюдений за морфологическим состояни-

ем культуры и отсутствием посторонней микрофлоры.

По истечении 51 ч культивирования накопившийся целевой продукт, секретлируемый продуцентом во внеклеточную среду, отделяли в виде надосадочной жидкости от биомассы методом центрифугирования на напольной центрифуге “4-16S” (Sigma, Германия) при 4100g в течении 20 мин без дальнейшей очистки.

Идентификация и концентрирование целевого белка

Наличие целевого белка в образцах надосадочной жидкости после ее отделения от клеток-продуцентов определяли методом белкового электрофореза. Разделение смеси белков проводили в денатурирующих условиях в камере Mini Protean (BioRad, США) с помощью одномерного электрофореза в 15%-ном ДСН-ПААГ по Лэммли [5], гели окрашивали раствором Кумасси.

Концентрирование полученного препарата проводили с использованием центрифужных концентраторов Microcon-10 (Merck Millipore Ltd, Ирландия) с порогом отсечения 10 кДа.

Определение амилолитической активности

Активность полученных образцов определяли с помощью набора “Альфа-АМИЛАЗА-1-ОЛЬВЕКС” (ООО “ОЛЬВЕКС ДИАГНОСТИКУМ”, Россия), предназначенного для количественного определения активности α-амилазы методом Каравея. Для проведения анализа готовили образцы рабочего раствора субстрата (PPC) для опытной и контрольной пробы. Каждый содержал 0.5 мл PPC, состоящего из фосфатного буфера и концентрированного картофельного крахмала в соотношении 24 : 1. PPC прогревали при температуре 37°C в течение 5 мин. К прогретому PPC для опытной пробы добавляли 10 мкл исследуемого образца. PPC для опытной и контрольной пробы снова прогревали при 37°C в течение 5 мин. Затем к пробам добавляли 4 мл рабочего раствора соляной кислоты, приготовленной в соотношении 15 : 1 из дистиллированной воды и 1.6 М соляной кислоты. К контрольной пробе добавляли 10 мкл исследуемого образца. Далее контрольную и опытную пробу смешивали с рабочим раствором йода, приготовленным в соотношении 7 : 1 : 2 из дистиллированной воды, концентрированного раствора йода и 3.87 mM раствора KF. Пробы тщательно перемешивали и измеряли величину пропускания против дистиллированной воды при длине волны 630 нм в кювете с длиной оптического пути 1.0 см на спектрофотометре ClarioStar Plus (BMG Labtech, Германия). Расчет активности (А, мг/(с л)) проводили по формуле:

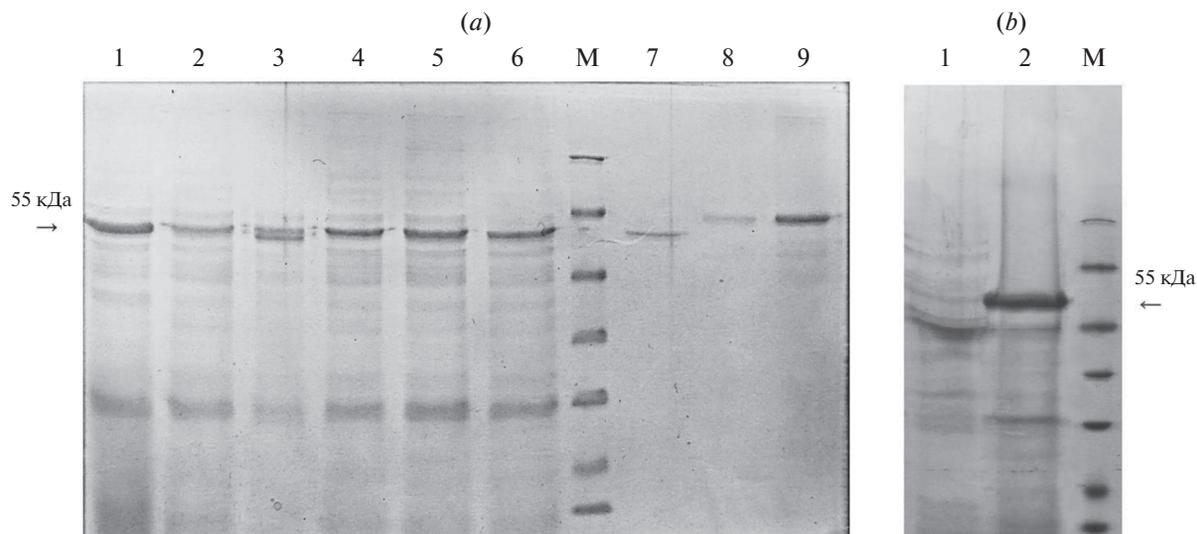


Рис. 1. Разделение белков в ДСН-ПААГ по Лэммли в образцах надосадочной жидкости, полученной при 120-часовом культивировании штаммов-продуцентов *B. mojavensis*. (a): 1 – штамм с плазмидой pBSU-AmyQ, 2 – 6 – штамм с плазмидой pHT255-AmyQ (клоны № 1, № 2, № 3, № 4 и № 6 соответственно), 7 – препарат α -амилазы *Bacillus* sp. (A6380 500 mg, Sigma), 8 – БСА (бычий сывороточный альбумин), 1000 мкг/мл, 9 – БСА, 1500 мкг/мл. (b): 1 – надосадочная жидкость реципиента *B. mojavensis*, 2 – штамм с плазмидой pBSU-AmyQ, М – маркер молекулярного веса “М35” (“СибЭнзим”, г. Новосибирск).

Fig. 1. Laemmli SDS-PAGE separation of proteins in supernatant samples obtained during 120-hour cultivation of *B. mojavensis* producer strains. (a): 1—strain with plasmid pBSU-AmyQ, 2–6—strain with plasmid pHT255-AmyQ (clones No. 1, No. 2, No. 3, No. 4 and No. 6, respectively), 7— α -amylase preparation of *Bacillus* sp. (A6380 500 mg, Sigma), 8—BSA (bovine serum albumin), 1000 μ g/mL, 9—BSA, 1500 μ g/mL. (b): 1—supernatant fluid of the recipient *B. mojavensis*, 2—strain with plasmid pBSU-AmyQ, M—molecular weight marker “M35” (“SibEnzyme”, Novosibirsk).

$$A = \frac{T_{\text{контр}} - T_{\text{оп}}}{T_{\text{контр}}} C t K,$$

где $T_{\text{оп}}$ – пропускание опытной пробы, $T_{\text{контр}}$ – пропускание контрольной пробы, C – коэффициент пересчета на 1 мг крахмала, t – коэффициент пересчета на 1 с инкубации, K – коэффициент пересчета на 1 л биологической жидкости. Пересчет единиц измерения мг/(с л) в У/мл проводили, используя коммерческий препарат с известной активностью (α -амилаза *Bacillus* sp. (A6380 500 mg, Sigma, Германия)).

Определение термостабильности и рН-оптимума активности фермента

Термостабильность целевого белка определяли путем предварительного прогревания образца надосадочной жидкости в течение 30 мин при температурах 45, 55, 65, 75, 85, 95 и 105°C. Далее оценивали амилолитическую активность по методике, описанной выше. Определение рН-оптимума проводили в диапазоне 5.8–8.0. В качестве образца сравнения использовали коммерческий препарат α -амилазы *Bacillus* sp. (A6380 500 mg, Sigma).

Статистический анализ проводили с использованием методов вариационной статистики в Microsoft Office Excel, достоверность различий между

средними значениями оценивали по t -критерию Стьюдента для независимых выборок при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение штаммов-продуцентов рекомбинантной α -амилазы и их культивирование

Для получения рекомбинантного белка с амилолитической активностью использовали штамм BDV-1 грамположительных бактерий *B. mojavensis*. В работе применяли рекомбинантные векторы, содержащие промотор Pgrac100: коммерчески доступный pHT255 [6] и полученный в работе на его основе pBSU. Синтетический промотор Pgrac100 включает оптимизированную последовательность -35 , -10 и $+1$, а также операторные области, необходимые для строгой регуляции синтеза мРНК встраиваемых генов. В составе этих векторов была клонирована последовательность α -амилазы *B. amyloliquefaciens*. После проведения электропорации клеток *B. mojavensis* с использованием рекомбинантных векторов были получены штаммы, трансформированные плазмидами pHT255-AmyQ и pBSU-AmyQ, которые культивировали глубинным способом в качалочных колбах. Для идентификации целевого белка в надосадочной жидкости был проведен электрофорез в ДСН-ПААГ (рис. 1).

Таблица 1. Амилолитическая активность (U/мл) надосадочной жидкости рекомбинантных штаммов на основе *B. mojavensis***Table 1.** Amylolytic activity (U/mL) of supernatant liquid recombinant strains based on *B. mojavensis*

Вариант вектора	Время наработки, ч		
	24	48	120
pBSU-AmyQ	19.44 ± 0.10	41.84 ± 0.06*	456.98 ± 3.44*
pHT255-AmyQ	19.52 ± 0.08	34.80 ± 0.04	48.86 ± 0.48

Примечание: * достоверное отличие от среднего значения по пяти клонам pHT255-AmyQ, $p < 0.05$.

Note: * significant difference from the average value for five pHT255-AmyQ clones, $p < 0.05$.

Таблица 2. Технологические показатели культивирования в колбах**Table 2.** Technological indicators of cultivation in flasks

Питательная среда	Оптическая плотность культуральной жидкости ($M \pm m$)				Титр на конец культивирования (96 ч) с 50 мл культуральной жидкости (КОЕ/мл)	Количество биомассы на конец культивирования (96 ч) с 50 мл культуральной жидкости (г)
	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч		
YTx2	0.651 ± 0.007	1.562 ± 0.032	1.443 ± 0.012	1.384 ± 0.011	$6.07 (\pm 0.25) \times 10^7$	0.40 ± 0.01
Меласно-кукурузная	0.571 ± 0.005	0.712 ± 0.011	1.067 ± 0.009	1.102 ± 0.014	$6.20 (\pm 0.30) \times 10^7$	0.36 ± 0.01
Меласно-кукурузная обогащенная	0.756 ± 0.015	1.461 ± 0.031	1.540 ± 0.043	1.443 ± 0.024	$8.44 (\pm 0.11) \times 10^8$	0.61 ± 0.03

Полученная электрофореграмма подтвердила наличие целевого белка (с молекулярной массой 55 кДа) во всех образцах надосадочной жидкости. Далее определяли амилолитическую активность в образцах, полученных при культивировании рекомбинантных штаммов в колбах в течение 24, 48 и 120 ч. Результаты определения активности α -амилазы представлены в табл. 1.

Согласно полученным результатам амилолитическая активность в анализируемых образцах повышалась при увеличении времени культивирования штаммов-продуцентов. В образцах надосадочной жидкости, наработанных штаммом с плазмидой pHT255-AmyQ (содержит ген для белка-репрессора), активность α -амилазы примерно в 10 раз ниже, чем в образце от штамма с плазмидой pBSU-AmyQ (не содержит последовательность, кодирующую белок-репрессор).

Таким образом, безиндукционная система наработки α -амилазы штаммом *B. mojavensis* с плазмидой pBSU-AmyQ более эффективна по сравнению с аналогичным штаммом, содержащим плазмиду pHT255-AmyQ, поэтому для дальнейшей работы использовали вариант штамма, трансформированного плазмидой pBSU-AmyQ.

Образец, проявивший наибольшую активность (pBSU-AmyQ, 120 ч культивирования), концентрировали с использованием центрифужных концентраторов при 14100g в течение 20 мин. В результате объем образца уменьшился в ~3.1 раза, а его активность увеличилась до 1297.81 ± 26.48 U/мл.

Был проведен эксперимент по подбору питательной среды для культивирования продуцента с использованием 3 сред — двух промышленных (меласно-кукурузная и меласно-кукурузная обогащенная) и одной лабораторно-исследовательской — YTx2.

Параметры роста и накопление количества биомассы микроорганизмов на всех используемых средах были схожи (табл. 2).

Однако амилолитической активности в образцах надосадочной жидкости при культивировании продуцента на промышленных средах обнаружено не было. Возможно, полученный продуцент не способен потреблять белок в кукурузном экстракте. Для дальнейшего культивирования была выбрана питательная среда YTx2.

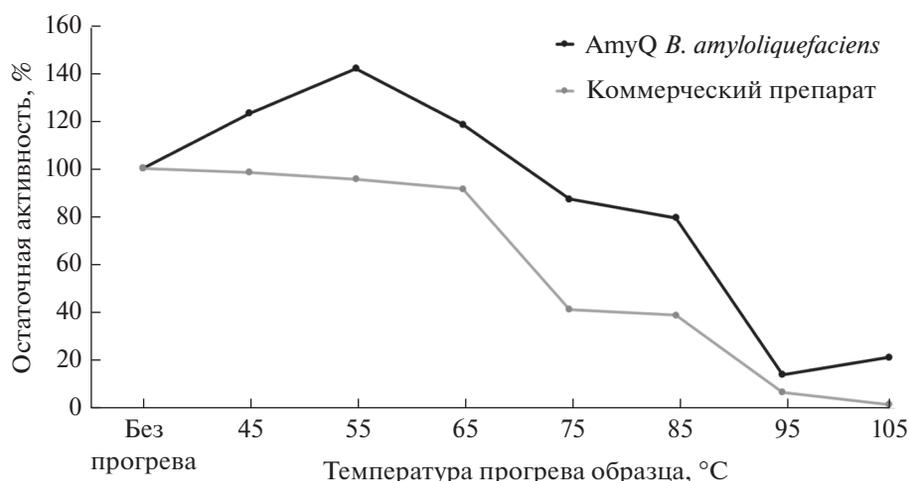


Рис. 2. Температурная зависимость активности полученной в работе α -амилазы из *B. amyloliquefaciens* и коммерческого препарата α -амилазы *Bacillus* sp. (A6380 500 mg, Sigma).

Fig. 2. Temperature dependence of activity of the α -amylase obtained in the work from *B. amyloliquefaciens* and the commercial preparation of α -amylase from *Bacillus* sp. (A6380 500 mg, Sigma).

Культивирование штамма-продуцента в ферментере

В процессе масштабирования биотехнологических процессов необходимо учитывать выход целевого продукта и его качество. На эти показатели влияет множество факторов, в том числе время и состав среды для культивирования продуцента. Было проведено определение оптимального времени наработки в ферментере с использованием наиболее эффективного штамма — *B. mojavensis*, трансформированного плазмидой pBSU-AmyQ. Для оценки амилолитической активности отбирали аликвоты из биореактора через 7, 24, 31, 48 и 52 ч культивирования. Согласно результатам, показатель варьировал в диапазоне от 201.44 ± 2.30 U/мл при 7 ч роста до 486.09 ± 10.76 U/мл при 52 ч. Образец, полученный через 31 ч культивирования в биореакторе, показал максимальную активность, которая составила 512.44 ± 4.47 U/мл. Дальнейшее культивирование продуцента не приводило к увеличению активности α -амилазы.

Характеристика рекомбинантной α -амилазы

Поскольку большинство промышленных процессов осуществляются в жестких физико-химических условиях, создание ферментов, проявляющих оптимальную активность в различных диапазонах pH и температуры, имеет важное значение [7, 8]. В настоящее время термофильные ферменты, в том числе α -амилазы, особо ценятся в промышленном биокатализе [9]. Действие α -амилазы на крахмал характеризуется быстрым уменьшением вязкости раствора и молекулярной массы олигосахаридов [10]. При этом по сравнению с ферментами из мезофилов препараты термостабильных α -ами-

лаз позволяют проводить разжижение крахмального клейстера с более высокой скоростью. Кроме того, последние проявляют активность не только к набухшему, но и к нативному крахмалу [11]. Эти свойства позволяют совершенствовать технологии создания препаратов микробных α -амилаз высокой термостабильности для гидролиза крахмала и препаратов, пригодных для гидролиза сырого, неклестеризованного крахмала.

Для образца α -амилазы *B. amyloliquefaciens*, полученной при помощи штамма, трансформированного плазмидой pBSU-AmyQ было изучено изменение амилолитической активности в зависимости от предварительного прогрева надосадочной жидкости в диапазоне температур 37–105 °С в течение 30 мин (рис. 2).

Согласно полученным данным, эффективность гидролиза крахмала увеличивалась при предварительном прогреве образца до 55 °С в течение 30 мин, при этом максимальное значение активности достигало 579.07 ± 8.81 U/мл. При дальнейшем повышении температуры прогрева образца происходило существенное снижение показателя. Инкубирование в течение 30 мин при 95 °С привело практически к полной инактивации фермента. Согласно данным, представленным на рис. 2, по сравнению с коммерческой мезофильной амилазой полученный рекомбинантный фермент обладает большей термостабильностью, так как его остаточная активность выше 80% сохраняется после прогрева образцов в течение 30 мин при температурах 45–85 °С, тогда как у коммерческого образца остаточная активность выше 80% зафиксирована при температурах 45–65 °С.

В исследуемом образце активность рекомбинантной амилазы в интервале значений pH 5.8–7.6

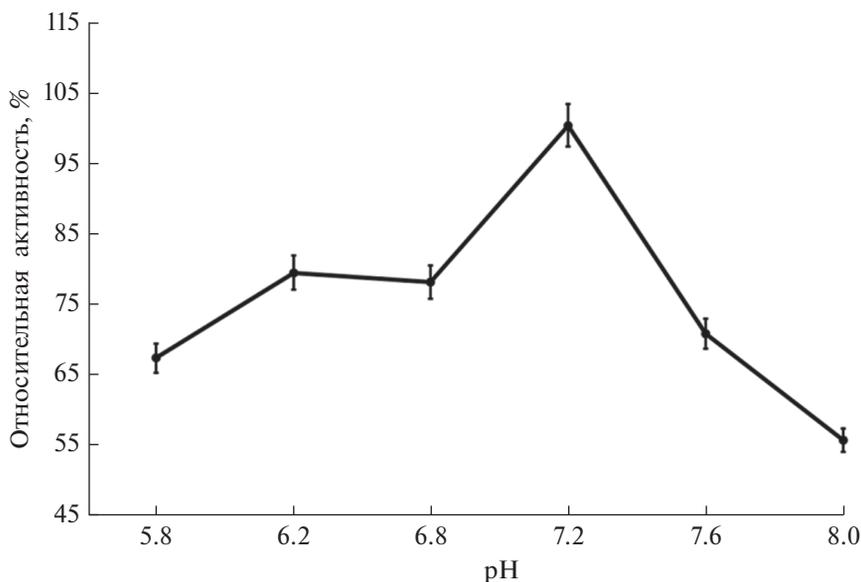


Рис. 3. Амилолитическая активность надосадочной жидкости, содержащей рекомбинантную α -амилазу (ген из *B. amyloliquefaciens*) при pH 5.8–8.0.

Fig. 3. Amylolytic activity of the supernatant containing recombinant α -amylase (gene from *B. amyloliquefaciens*) at pH 5.8–8.0.

составляет не менее 65% с максимумом при pH 7.2 (рис. 3).

Полученные данные согласуются с другими работами, в которых представлены оптимальные значения температуры и pH проявления активности амилаз разных штаммов *Bacillus* sp. Так, китайские ученые использовали неочищенную α -

амилазу из *B. amyloliquefaciens* ВН072, pH и температурный оптимум активности которой составлял 7.0 и 60°C соответственно [12]. Исследователи из Туниса получили очищенную ионообменной хроматографией α -амилазу из *B. mojavensis* SA, для активности которой оптимальные pH и температура составляли 9.0 и 55°C [13]. М. Калимку-



Рис. 4. Изменение амилолитической активности надосадочной жидкости, содержащей рекомбинантную α -амилазу из *B. amyloliquefaciens*, при дополнительном внесении CaCl_2 в среду для культивирования.

Fig. 4. Change in the amylolytic activity of the supernatant containing recombinant α -amylase from *B. amyloliquefaciens* with additional addition of CaCl_2 to the culture medium.

ловой и соавт. при изучении активности α -амилазы Amy1UA7 из *Bacillus subtilis*, полученной в рекомбинантной форме в клетках *Escherichia coli* в диапазоне pH от 1.5 до 11.0 было показано, что оптимальным значением оказалось 7.0 [1].

В составе многих амилаз содержатся ионы кальция, которые важны для проявления активности и стабильности фермента. Кальций-независимые амилазы (так называемые “истинные”), как правило, менее термостабильны, чем кальций-зависимые. В данном исследовании провели оценку влияния концентрации ионов кальция на изменение амилазной активности надосадочной жидкости при культивировании полученного продуцента. Для этого в питательную среду добавляли хлорид кальция до конечной концентрации 0.5, 1, 2, 3 и 4 г/л. По результатам 48-часовой наработки было показано незначительное увеличение амилазной активности при внесении в питательную среду 0.5 г/л CaCl₂ по сравнению с образцом без добавления хлорида кальция. При увеличении количества вносимого CaCl₂ выявлена обратно-пропорциональная зависимость между анализируемыми показателями, то есть при увеличении концентрации хлорида кальция в среде происходило снижение амилазной активности (рис. 4), в то время как по данным работы [1] добавление ионов кальция в питательную среду существенно не влияло на активность амилазы. Выявленная нами закономерность, возможно, обусловлена высоким осмотическим давлением в среде в присутствии избытка хлоридов, так как YTx2 в своем составе уже содержит 5 г/л NaCl и дополнительное внесение большого количества CaCl₂ может приводить к анабиозу, либо лизису клеток, вследствие чего амилазная активность надосадочной жидкости снижается.

Востребованность высококачественных амилазных ферментов в различных отраслях промышленности делает чрезвычайно актуальной задачу по созданию перспективных продуцентов [14] и подбору оптимальных условий промышленной наработки. Полученные нами результаты показывают принципиальную возможность создания штаммов-продуцентов рекомбинантной α -амилазы на основе штамма *B. mojavensis* BDV-1. Полученный в безындукционной системе pBSU-AmyQ рекомбинантный фермент по профилю термостабильности близок к α -амилазе *B. subtilis*, проявляя максимум активности в районе 60°C. Оптимальное время культивирования на питательной среде YTx2 в биореакторе составляет 31 ч.

ФИНАНСИРОВАНИЕ.

Работа поддержана средствами программы развития ФГБОУ ВО “Алтайский государственный университет” “Приоритет-2030”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калимкулова М., Кирибаева А., Мухамедьяров Д., Куламетов Ж., Ахметоллаев И., Силаев Д., Хасенов Б. Получение рекомбинантной α -амилазы Amy1UA7 из *Bacillus subtilis* в клетках *Escherichia coli*. *Биотехнология. Теория и практика*, 2015, (4), 57–65. <https://doi.org/10.11134/btp.4.2015.7>
2. Singh R., Kim S., Kumari A., Mehta K.P. An Overview of Microbial α -amylase and Recent Biotechnological Developments. *Curr. Biotechnol.*, 2022, (11), 11–26. <https://doi.org/10.2174/2211550111666220328141044>
3. Rana N., Verma N., Vaidya D., Dipta B. Application of bacterial amylase in clarification of juices and bun making. *J. Pharmacogn. Phytochem.*, 2017, 6(5), 859–864. <https://doi.org/10.21276/ap.2017.6.2.9>
4. Hu X., Yuan X., He N., Zhuang T., Wu P., Zhang G. Expression of *Bacillus licheniformis* α -amylase in *Pichia pastoris* without antibiotics-resistant gene and effects of glycosylation on the enzymic thermostability. *Biotech.*, 2019, (9), 427. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1943-x>
5. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
6. Phan T.T., Tran L.T., Schumann W., Nguyen H.D. Development of Pgrac100-based expression vectors allowing high protein production levels in *Bacillus subtilis* and relatively low basal expression in *Escherichia coli*. *Microb. Cell. Fact.*, 2015, 14 (72), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0255-z>
7. Aladejana O.M., Oyediji O., Omoboye O.O., Bakare M.K. Production, purification and characterization of thermostable alpha amylase from *Bacillus subtilis* Y25 isolated from decaying yam. *Not. Sci. Biol.*, 2020, 12 (1), 154–171. <https://doi.org/10.15835/nsb12110521>
8. Lim Si J., Hazwani-Oslan S.N., Oslan Si N. Purification and Characterisation of Thermostable α -Amylases from Microbial Sources. *BioResources*, 2020, 15 (1), 2005–2029. <https://doi.org/10.15376/biores.15.1.Lim>
9. Донков С.А., Кадетова М.Ю. Ферментативный гидролиз крахмала и крахмалсодержащего растительного сырья при получении сахаросодержащих продуктов для животноводства. *Вестник КрасГАУ*, 2019, 3(144), 116–121.
10. Серба Е.М., Оверченко М.Б., Римарева М.Л., Игнатова Н.И., Орехова А.Е., Павлова А.А. Способы ферментативно-гидролитической подготовки зернового суслу для спиртового брожения. *Вестник российской сельскохозяйственной науки*, 2020, (5), 52–56.
11. Деревенков И.А., Макаров С.В. Биотехнологические основы пищевых производств. Иваново: Иван. гос. хим.-технол. ун-т, 2017, 85.
12. Du R., Song Q., Zhang Q., Zhao F., Kim R.-C., Zhou Z., Han Y. Purification and characterization of novel thermostable and Ca-independent α -amylase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BH072. *Int. J. Biol. Macro-*

- mol.*, 2018, 115, 1151–1156.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.004>
13. Hammami A., Fakhfakh N., Abdelhedi O., Nasri M., Bayoudh A. Proteolytic and amyolytic enzymes from a newly isolated *Bacillus mojavensis* SA: Characterization and applications as laundry detergent additive and in leather processing. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, 108, 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.148>
14. Василова Л., Хидиятова А., Борисенков А. Скрининг микроорганизмов – продуцентов амилаз. *Башкирский химический журнал*, 2018, 25(4), 30–33. <https://doi.org/10.17122/bcj-2018-4-30-33>

Production of α -Amylase *Bacillus amyloliquefaciens* in the Expression System of *Bacillus mojavensis* and Properties of the Recombinant Enzyme

V. Yu. Chirkova^{a, #}, D. N. Shcherbakov^{a, b}, P. V. Kolosov^a, M. V. Shirmanov^a, E. A. Kolosova^{a, b}, A. V. Malkova^a, E. A. Sharlaeva^a, A. N. Irkitova^a, and I. Yu. Evdokimov^a

^aAltai State University, Barnaul, 656049 Russia

^bState Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector” of Rospotrebnadzor, Koltsovo, 630559 Russia

[#]e-mail: varvara.chirkova@gmail.com

Abstract—The conditions of recombinant α -amylase production in an induction-free cultivation system based on *Bacillus mojavensis* are described. Fermentation was carried out in pilot fermenters under deep cultivation, which ensured the production of experimental batches in the quantities necessary for comprehensive studies of the obtained samples. Gradual accumulation of recombinant enzyme in the bioreactor reaches a maximum after 31 hours. Some biochemical parameters of the recombinant enzyme were studied. Its thermostability was established and pH optimum of activity manifestation was determined—the maximum efficiency of substrate hydrolysis was observed when the sample was preheated for 30 min at a temperature of 55°C and pH equal to 7.2. An inversely proportional relationship between the change in the level of amyolytic activity and the amount of calcium chloride added during cultivation was revealed. The possibility of creating strains producing recombinant α -amylase on the basis of *B. mojavensis* strain BDV-1 was demonstrated.

Keywords: *Bacillus mojavensis*, recombinant enzymes, α -amylase, cultivation, bioreactor, fermentation, induction, activity