

## ИЗУЧЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ АМИЛАЗЫ ШТАММА *BACILLUS PARALICHENIFORMIS*

В.С. Попова<sup>1</sup>, А.К. Кирибаева<sup>2</sup>, Д.В. Силаев<sup>2</sup>, Б.Б. Хасенов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилёва, Республика Казахстан, 010000, г. Астана, Сатпаева, 2

<sup>2</sup>Национальный центр биотехнологии, Республика Казахстан, 010000, г. Астана, Кургальжинское шоссе, 13/5

e-mail: viktoria.popova38@gmail.com

$\alpha$ -Амилазы (КФ 3.2.1.1) являются гидролитическими ферментами, расщепляющими гликозидные связи в молекулах крахмала, с образованием декстринов и олигосахаридов. Для промышленной переработки крахмала особый интерес представляют термостабильные микробные  $\alpha$ -амилазы, которые используются для осахаривания и разжижения крахмала при температурах превышающих 70–75°C. Известно, что среди бациллярных  $\alpha$ -амилаз часто встречаются термостабильные и щелочные  $\alpha$ -амилазы. Целью работы является получение рекомбинантной  $\alpha$ -амилазы из *Bacillus paralicheniformis* и изучение ее биохимических свойств.

Путем анализа полной последовательности генома штамма *Bacillus paralicheniformis* (GenBank NCBI, номер доступа CP124861) выбрана последовательность гена *amyS*, насчитывающая 1535 пар оснований. Биоинформатический анализ белкового продукта показал, что ген кодирует  $\alpha$ -амилазу, содержащую сигнальный пептид MKQHKRLYARLLPLLALIFLLPHSAAAA. Были подобраны олигонуклеотиды для клонирования гена без сигнального пептида. Клонирование гена *amyS* в векторе pET-28c(+) проводили с использованием ферментов нуклеинового обмена по сайтам NdeI и NotI. Результирующий белковый продукт содержал гексагистициновую метку. Трансформацией компетентных клеток *Escherichia coli* штамма ArcticExpress(DE3)RP был получен рекомбинантный штамм, продуцирующий  $\alpha$ -амилазу rAmyS с молекулярной массой 58,8 кДа. Культура штамма была индуцирована изопропил- $\beta$ -тиогалактопиранозидом в концентрации 0.25 мМ, что позволило провести внутриклеточное накопление рекомбинантного белка rAmyS. Клетки были лизированы лизоцимом, а рекомбинантный белок был выделен с по-

мощью металлоаффинной хроматографии на ионах Ni<sup>2+</sup>.

Изучение биохимических параметров рекомбинантной  $\alpha$ -амилазы показало, что фермент активен в температурном диапазоне от 55°C до 90°C с максимумом 85°C. Исследование термостабильности показало, что при инкубации при 70°C в течение 60 минут остаточная амилазная активность составляла 60% от максимального значения. После инкубации при 80°C в течение 60 минут остаточная амилазная активность составила 43%. Тестирование фермента в pH диапазоне с 4,0 по 11,0 показало, что оптимальным значением pH является 6,0. При изучении влияния ионов металлов на активность рекомбинантной  $\alpha$ -амилазы установлено, что фермент обладает чувствительностью к Fe (III). В присутствии Fe<sup>3+</sup> активность фермента уменьшается на 78,5%. Исследование амилолитической активности рекомбинантного фермента методом ДНС показало, что удельная активность рекомбинантного белка rAmyS составляет 421 Ед/мг. Методом тонкослойной хроматографии идентифицированы продукты гидролиза картофельного крахмала при его инкубации с рекомбинантной  $\alpha$ -амилазой rAmyS при температуре 50°C и pH 7. Установлено, что ферментативный гидролиз крахмала при данных условиях протекает в течение первых 15 минут и основными продуктами гидролиза выступают: глюкоза, мальтоза, мальтотреоза, мальтотетраоза и мальтопентаоза. Таким образом, можно отметить, что  $\alpha$ -амилаза из штамма *Bacillus paralicheniformis* вследствие своей высокой удельной активности, повышенной термостабильности, толерантности к ряду металлов, представляется перспективным ферментом для использования в технологиях гидролиза крахмала и крахмалсодержащего сырья.