

2. Овсянникова Е. А., Киселева Т. Ф., Потапов А. Н., Дюжнев А. В. // Техника и технология пищевых производств. 2012. № 4. С. 1–4.
3. Методы технoхимического контроля в виноделии. Под ред. В. Г. Гержиковой Симферополь: Таврида, 2002. 260 с.

УДК 663.1

**К. В. Старожилова<sup>1,2</sup>, Д. Н. Щербаков<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, Россия, Новосибирская область, р. п. Кольцово, ksenka0611@mail.ru,

<sup>2</sup>Алтайский государственный университет, 656049, Россия, г. Барнаул, пр. Ленина, 61

## **РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* ПРОДУЦЕНТА АЛЬФА-АМИЛАЗЫ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS***

**Ключевые слова:** альфа-амилаза, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*.

Альфа-амилаза – фермент класса гидролаз, катализирующий гидролитическое расщепление  $\alpha$ -1,4-гликозидных связей внутри полимерного субстрата, в частности крахмала. Основные сферы использования  $\alpha$ -амилаз: пищевая, спиртовая промышленности и отрасль детергентов (моющих веществ).

Альфа-амилаза *Bacillus amyloliquefaciens* обладает параметрами, необходимыми для использования в промышленных масштабах, в частности – высокой термостабильностью и устойчивостью в щелочных средах.

Выбор *Bacillus subtilis* в качестве продуцента обусловлен рядом причин: *B. subtilis* имеет общепризнанный безопасный статус по системе GRAS и с ним легко проводить генетические манипуляции, эти бактерии, в отличие от *E. Coli*, обладают системой секреции, что значительно облегчает работы по очистке целевого белка.

Целью данной работы было создание эффективного продуцента альфа-амилазы *B. amyloliquefaciens* на основе *B. subtilis*.

В качестве экспрессионного вектора была выбрана плаزمида pHT255. Этот вектор содержит «сильный» синтетический промотер P<sub>grac</sub>, обеспечивающий высокий уровень синтеза целевой РНК. Кроме того, этот вектор содержит последовательность, кодирующую белок-репрессор LacI, обеспечивающий

контроль синтеза мРНК, это имеет высокую ценность при экспрессии генов гетерологичных белков, способных оказывать токсическое действие на клетки. В случае гомологичных белков использование системы с белком-репрессором может оказывать обратный эффект, снижая уровень синтеза целевого белка.

Исходя из этого, первым этапом работы стало конструирование нового вектора, включающего «сильный» промотер P<sub>grac</sub>, без гена белка-репрессора.

В составе полученного вектора pBSU и исходного вектора pHT255 был клонирован ген альфа-амилазы *Bacillus amyloliquefaciens*, синтезированный на заказ. После подтверждения нуклеотидной последовательности встройки при помощи секвенирования по Сенгеру полученными плазмидами была проведена трансформация (электропорация) *Bacillus subtilis* штамм WB800N.

Для оценки эффективности синтеза и секреции альфа-амилазы ночную культуру рекомбинантных штаммов *Bacillus subtilis* WB800N/pHT255-AmyQ и *Bacillus subtilis* WB800N/pBSU-AmyQ переносили в пробирки и культивировали до достижения оптической плотности 0,6. Затем культуру переносили в пробирки и добавляли индуктор (условия индукции представлены в таблице 1). В случае *Bacillus subtilis* WB800N/pBSU-AmyQ продолжали культивирование.

Таблица 1

Условия культивирования *Bacillus subtilis* WB800N/pHT255-AmyQ

Температура	37 °С	37 °С	37 °С	30 °С	30 °С	30 °С
Концентрация ИПТГ						
0 мМ	2 ч	4 ч	20 ч	2 ч	4 ч	20 ч
0,01 мМ	2 ч	4 ч	20 ч	2 ч	4 ч	20 ч
0,1 мМ	2 ч	4 ч	20 ч	2 ч	4 ч	20 ч
1 мМ	2 ч	4 ч	20 ч	2 ч	4 ч	20 ч

Для анализа накопления альфа-амилазы использовали электрофоретическое разделение белка в 12 % полиакриламидном геле (ПААГ), ферментативную активность определяли методом Каравея. Лучший результат для штамма *Bacillus subtilis* WB800N/pHT255-AmyQ был получен при температуре культивирования – 30 °С, времени культивирования – 20 ч, концентрация ИПТГ – 0,1 мМ. Культивирование *Bacillus subtilis* WB800N/pBSU-AmyQ в сходных условиях, но без добавления индуктора позволило получить большую в 1,5 раза концентрацию и активность фермента.

Таким образом, в ходе работы была получен штамм *Bacillus subtilis* WB800N/pBSU-AmyQ и подобраны условия культивирования, обеспечивающие накопления в культуральной среде фермента с активностью до 38 тыс. единиц.