

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-115

**НОВАЯ ГИБРИДНАЯ В-АМИЛАЗА:
ХАРАКТЕРИСТИКА И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ*****A NOVEL HYBRID B-AMYLASE: CHARACTERISATION AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL**

В. Г. Чепурко, С. П. Синеокий, Т. Л. Гордеева

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

V. G. Chepurko, S. P. Sineokiy, T. L. Gordeeva

National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow

✉ vgchepurko@gmail.com

Аннотация

В клетках *Komagataella phaffii* были экспрессированы гены, кодирующие β -амилазу из *Priestia megaterium* и гибридную β -амилазу Hyb1, состоящую из каталитического домена β -амилазы из *Priestia flexa* и крахмал-связывающего домена β -амилазы из *P. megaterium*. В отличие от β -амилазы из *P. megaterium*, фермент Hyb1 обладал расширенным рабочим интервалом pH и повышенной термостабильностью. Hyb1 сохранял около 67 % активности после инкубации в течение 40 мин при 50 °C.

Abstract

The genes encoding β -amylase from *Priestia megaterium* and hybrid β -amylase Hyb1, consisting of the catalytic domain of β -amylase from *Priestia flexa* and the starch-binding domain of β -amylase from *P. megaterium*, were expressed in *Komagataella phaffii* cells. In contrast to β -amylase from *P. megaterium*, the Hyb1 enzyme had an extended pH range and increased thermostability. Hyb1 retained about 67 % of activity after incubation for 40 min at 50 °C.

β -Амилаза (ЕС 3.2.1.2) — фермент класса гидролаз, расщепляющий α -1,4-гликозидные связи с нередуцирующего конца в молекулах глюкоканов с образованием мальтозы. β -Амилаза применяется в процессах осахаривания крахмала при производстве мальтозного сиропа и алкогольных напитков.

В промышленности чаще всего используют β -амилазы, экстрагированные из растительного сырья. Однако такие препараты отличаются нестабильностью при хранении, а также цена на них зависит от климатических условий, урожайности и спроса на посевные площади. Поэтому актуальной задачей является поиск β -амилаз с промышленно ценными свойствами и их получение с помощью микробиологического синтеза. Так, продуценты ферментов на основе метилотрофных дрожжей *K. phaffii* обладают рядом преимуществ и широко используются в промышленной биотехнологии.

Цель исследования — получение рекомбинантной β -амилазы с промышленно ценными свойствами.

В качестве реципиента был выбран штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-4287, обладающий высоким экспрессионным потенциалом. Ген, кодирующий β -амилазу из *P. megaterium*, был клонирован в состав интегративного экспрессионного вектора pPICZ α в единой рамке считывания с нуклеотидной последовательностью сигнального пептида α -фактора *Saccharomyces cerevisiae* и под контролем индуцибельного промотора PAOX1. В результате была получена плаزمида pPICZ α -amyB2.

Полученная плазмида была линейаризована при помощи эндонуклеазы рестрикции *Bgl*III и трансформирована в клетки *K. phaffii* методом электропорации. Были получены трансформанты, секретирующие β -амилазу в культуральную жидкость.

Максимальная активность рекомбинантной β -амилазы проявлялась при 40 °C и pH 6,5. Для промышленности ценность представляют β -амилазы, осуществляющие реакцию гидролиза крахмала при pH 5,0 и температурах 50–65 °C в течение 40 мин. Однако рекомбинантный фермент полностью инактивировался после инкубирования при указанных условиях и температуре 50 °C.

Для улучшения свойств рекомбинантной β -амилазы была получена гибридная β -амилаза Hyb1, состоящая из каталитического домена β -амилазы из *P. flexa* и крахмал-связывающего домена β -амилазы из *P. megaterium*. Ген, кодирующий Hyb1, был синтезирован методом перекрывающихся праймеров и клонирован в состав векто-

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (грант № 075-15-2019-1659) на базе БРЦ ВКПМ.

ра pPICZ α , как описано выше. Получена плаزمида pPICZ α -hub1, которую линеаризовали и трансформировали в клетки *K. phaffii*.

Гибридная β -амилаза Hyb1 демонстрировала максимальную активность при температуре 40 °C и pH 7,0. Обнаружено, что рабочий диапазон pH гибридной β -амилазы расширился: при pH 5,0 относительная активность Hyb1 составила 65 %, что на 25 % больше по сравнению с таковой для β -амилазы из *P. megaterium*. Кроме этого, в отличие от β -амилазы из *P. megaterium*, фермент Hyb1 обладал повышенной термостабильностью и сохранял около 67 % активности после инкубации в течение 40 мин при 50 °C.

Таким образом, замена каталитического домена β -амилазы из *P. megaterium* на каталитический домен из *P. flexa* позволила получить фермент с повышенной термостабильностью и pH, смещенным к значениям, используемым на производстве. Свойства полученной гибридной β -амилазы делают ее потенциально пригодной для использования в промышленных процессах.