

ӘОЖ 577.15

BACILLUS PARALICHENIFORMIS T7 СПОРОГЕНДІ ШТАММЫНАН АЛЫНҒАН ЭСТЕРАЗАНЫҢ СУБСТРАТТЫҚ АРНАЙЫЛЫҒЫ МЕН КИНЕТИКАЛЫҚ ПАРАМЕТРЛЕРІН ЗЕРТТЕУМусахметов А.^{1,2,3} , Астраханов М.¹ , Акишев Ж.^{1,3} , Хасенов Б.^{1,3*} ¹ «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС. Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана қ., 010000.² «Еуразия Ұлттық университеті» КеАҚ. Сәтбаев к-сі, 2, Астана қ., 010000.³ «GenLab» ЖШС. М.Габдуллина к., 19/1. Казахстан, Астана, 010000.

*khassenov@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Эстеразалар биотехнологияда жоғары катализдік белсенділігі, субстраттық арнайылығы және әртүрлі физика-химиялық әсерлерге төзімділігі арқасында кеңінен қолданылатын гидролазалық ферменттердің маңызды класы болып табылады. *Bacillus paralicheniformis* T7 спорогенді штаммы спора түзу және стреттік жағдайларға бейімделу үрдістеріне қатысатын жасушадан тыс ферменттерді, соның ішінде эстеразаны өндіреді. Берілген жұмыста *Escherichia coli* жасушаларында алынған *B. paralicheniformis* T7 спорогенді штаммының EST-28 рекомбинантты эстеразасының субстраттық арнайылығы мен катализдік қасиеттеріне зерттеу жүргізілді. Құрылымдық талдау эстеразаның GDSL/SGNH-гидролазалар отбасына жататынын және құрамында консервативті Ser–Asp–His катализдік триадасы бар екенін көрсетті. р-нитрофенил эфирлерін (C2–C18) қолдана отырып жүргізілген субстраттық арнайылықты анықтау жұмыстары ферменттің қысқа тізбекті субстраттарға, атап айтқанда р-нитрофенилацетатқа ($250,0 \pm 0,1$ бірлік/мг) ең жоғары белсенділікті көрсетіп, осы ферментті шынайы эстеразаларға жатқызуға мүмкіндік береді. Әртүрлі факторлардың әсерін зерттеу барысында қос валентті металл иондары (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}) фермент белсенділігін төмендетті, ал DTT және β -меркаптоэтанол секілді тотықсыздандырғыш агенттер ферменттің катализдік белсендігін толықтай тежейтіні анықталды. Сонымен қатар, фермент иондық емес детергенттерге және натрий додецилсульфатына салыстырмалы түрдегі төзімділікті көрсетеді. Кинетикалық талдау тәжірибелер нәтижесінде р-нитрофенилацетат үшін K_m мәні 26,18 мМ, V_{max} – 52,37 бірлік/мг, ал катализдік константасы k_{cat} – $1,74 \text{ c}^{-1}$ тең болды. Алынған нәтижелер ферменттің субстратқа деген айқын аффинділігі мен басқа бациллалық эстеразалармен салыстырғанда орташа катализдік тиімділігін көрсетті. Осылайша, EST-28 эстеразасы қысқа тізбекті эфирлерге тән арнайылығы мен бірқатар беткейлі белсенді заттарға төзімділігімен сипатталады, бұл оны тамақ және парфюмерия өнеркәсібінде қолданылатын күрделі эфирлердің биокатализдік синтезінде пайдаланудың келешегі зор екенін көрсетеді.

Кілтті сөздер: Эстераза, Эндоспора, Субстрат, Белсенділік, *Bacillus*.**КІРІСПЕ**

Эстеразалар жасушалық сигналингін, фосфор метаболизмін, табиғи және синтетикалық заттардың детоксикациясын, нуклеин қышқылдары, липидтер мен эфирлер сияқты биомолекулалар мен полимерлердің синтезі мен ыдырауын қоса алғанда, әртүрлі биологиялық үрдістерге қатысады [1]. Эстеразалар гидролазалық ферменттер класына жатып (КФ 3.1.1.1), май қышқылдарының күрделі эфирлер гидролизін және қайта этерификациялануын катализдейді [2]. Құрылымдық ұйымдасуы бойынша бұл ферменттер сериндік гидролазалар тобының мүшелері болып, оларға тән α/β -гидролазалық қатпарға ие [3]. Олардың катализдік механизмі белсенді орталықта орналасқан серин, гистидин және аспарат немесе глутаматтан тұратын аминқышқылдарының триадасына негізделген [2]. Липазалармен салыстырғанда, эстеразалар кинетикалық қасиеттері мен субстраттық арнайылығы бойынша ерекшеленеді [4]. Атап айтқанда, эстеразалар негізінен көмірсутек тізбегі қысқа (көміртек атомы <10) суда еритін май қышқылдарының эфирлерін гидролиздейді, ал липазалар ұзын тізбекті (көміртек атомы ≥ 10) суда ерімейтін триглицеридтерге әсер етеді [5]. Практикалық қолданысы тұрғысынан микробтық эстеразалар өздерінің жоғары белсенділігі, температура мен рН көрсеткіштерінің кең ауқымындағы тұрақтылығы, сондай-ақ еріткіштер мен жуғыш заттарға төзімділігі арқасында жоғары құндылыққа ие. Сондықтан микробтық эстеразалар биоотын

өндірісі, тамақ өнеркәсібі, пестицидтерді жою, фармацевтикалық синтез және опа-далап сияқты салаларда қолданылады [6]. Эстераза өндіретін және өндірістік маңызы бар микроағзаларға *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* және *Bacillus* туыстарының бактериялары жатады [7-9]. *Bacillus* эстеразалары мен липазаларының арнайылығы мен энантиоселективтілігі оларды көптеген фармацевтикалық препараттар мен хиралды химиялық заттарды өндіру үшін қолданылатын, D-метиллактаттар сияқты, оптикалық таза қосылыстарды синтездеудің құнды құралына айналдырады [10]. Сонымен қатар, бұл ферменттер жоғары энантиомерлік артықшылығы бар қосылыстарды стереоселективті әдіспен алу үшін қолданылады, бұл кейінгі кезеңдердегі тазарту шығындарын азайтып, фармацевтикалық өндіріс үрдістерінің жалпы тиімділігін арттырады [10]. Осыған қоса, *Bacillus* липазаларының жоғары субстраттық арнайылығы мен сенімді катализдік профильдері оларды адамның метаболизм жолдарын модельдеу және дәрілік заттардың болжам өзара әрекеттесуін бағалау үшін дәрілік заттардың метаболизмін зерттеуде қолдануын жеңілдетеді [11]. Осындай ферменттер күрделі эфирлер мен хош иісті қосылыстар синтезінде, липофильді ластаушы заттардың биоыдыратуына, сондай-ақ тамақ және мұнай өңдеу өнеркәсібінде биокатализатор ретінде пайдаланылады [12]. *Bacillus* туысының өкілдері термо- және сілтілік тұрақтылық, сондай-ақ детергенттер қатысында жұмыс істеу қабілеті сияқты қа-

жетті өндірістік қасиеттері бар функционалды GDSE-эстеразалаға ие [13].

Бұған дейін Тараз қаласының топырағынан бөлініп алынған *Bacillus paralicheniformis* T7 штаммының эстераздық белсенділігі бар екені анықталған болатын [14]. *Escherichia coli* жасушаларында EST-28 рекомбинантты эстеразасы алынып, оның температуралық және қышқылдық-негіздік көрсеткіштері зерттелді [15]. Берілген зерттеудің мақсаты алынған рекомбинантты эстеразаның субстраттық арнайылығын зерттеу, металл иондарының, тотықсыздандырғыш және хелаттаушы агенттер мен детергенттердің ферментативті белсенділікке әсерін және рекомбинантты эстеразаның кинетикалық параметрлерін анықтау болып табылады.

МАТЕРИАЛДАР МЕН ӘДІСТЕР

Реагенттер, коректік орталар, ферменттер

Барлық химиялық реактивтер Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, АҚШ) және AppliChem (Дармштадт, Германия) компанияларынан алынды. *E. coli* дақылдандыру үшін pH 7,0 тең, құрамында 0,5% ашытқы экстракты (Condalab, Мадрид, Испания), 1% триптон (Sigma-Aldrich) және 0,5% NaCl (Sigma-Aldrich) бар лизогенді ортасы (LB) қолданылды.

Рекомбинантты эстеразаны хроматографиялық тазарту

Рекомбинантты эстеразаның өндіруші-штамм жасушалары құрамында канамицині (50 мкг/мл) бар 1 литр лизогенді ортада $OD_{600}=0,6$ көрсеткішіне жеткенге дейін 37°C температурада IKA 4000i control (IKA-Werke, Германия) шейкер-инкубаторында өсірілді. Кейін 0,5 мМ концентрациядағы изопропил-beta-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) қосылып, ақуыз индукциясы Climo-Shaker ISF1-X (Kuhner, Швейцария) шейкер-инкубаторында 18°C жағдайында 16 сағат бойы жүргізілді. Жасушалар Eppendorf 5920R (Eppendorf, Германия) центрифугасында 4°C, 6000×g жылдамдықта 6 минут бойы жиналып, Sonicators (Qsonica, АҚШ) соникаторында ультрадыбыспен жасушалардың лизисы жүргізілді. Суда еритін фракциясы Coulter Avanti J-26S XP (Beckman, АҚШ) центрифугасында 4°C, 40000×g жылдамдықта 1 сағат бойы центрифугаланып, алдын ала 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол буферімен теңестірілген Ni-NTA (Invitrogen, Германия) бағанасына енгізілді. Рекомбинантты ақуыз 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 500 мМ NaCl буферіндегі имидазолдың сатылы градиентімен (80 мМ, 100 мМ, 120 мМ, 150 мМ, 200 мМ және 250 мМ) элюцияланды. Фракциялар ПААГ-ДСН электрофорезі арқылы айқындалып талданды. Нысаналы фракциялар концентрленіп, өткізу шегі 10 000 Да болатын ақуыздық концентраторында (Pierce™ Protein Concentrators PES, Thermo Fisher Scientific) ерітінділік буфері ауыстырылды, ақуыз концентрациясы өлшеніп, кейінгі тәжірибелерде пайдаланылды.

Ферменттердің белсенділігін анықтау

Эстераза белсенділігі Чжао және басқ. [16] әдісі бойынша өлшенді. Қысқа түрде, Қысқаша айтқанда, 100 мкл үлгі мен 50 мкл субстрат (изопропанолда ерітілген 10 мМ р-нитрофенилацетат) pH 7,0 тең 350 мкл 50 мМ натрий фосфатты буферіне қосылды. Кейін, реакциялық қоспа

40°C температурада 10 минут бойы инкубацияланды, реакция 1 мл этанол спиртін қосу арқылы тоқтатылды. Осыдан кейін ерітінді 1000 × g жылдамдықта 3 минут бойы центрифугаланып, UV1900i (Shimadzu, Киото, Жапония) спектрофотометрінің көмегімен 410 нм толқын ұзындығында өлшенді. Эстераздық белсенділіктің бір бірлігі берілген жағдайларда минутына 1 мкмоль р-нитрофенолдың (pNP) түзілуіне сәйкес келді.

Ақуыз концентрациясын өлшеу

Ақуыз концентрациясы Бредфорд әдісімен [17] ақуызды анықтауға арналған реагентті (Bio-Rad Laboratories, АҚШ) қолдану арқылы анықталды. Стандарт ретінде бұқа сарысуының альбумині пайдаланылды. Қысқаша сипаттамасы: 100 мкл Бредфорд реагенті, құрамында 1% глицерин бар, 860 мкл 10%-дық фосфатты буферлі ерітіндісімен араластырылып, оған 40 мкл үлгі қосылды. Ерітінді араластырылып, бөлме температурасында 2 минут бойы инкубацияланды. Кейін спектрофотометрде 595 нм толқын ұзындығында оптикалық тығыздық өлшенді.

Металл иондары мен детергенттердің эстераза белсенділігіне әсері

Металл иондарының эстераза белсенділігіне әсері келесі тұздарды қолдану арқылы анықталды: CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, CuCl₂, ZnCl₂ және FeSO₄. Металл иондарының, тотықсыздандырғыштар — beta-меркаптоэтанол мен дитиотреитолдың (ДТТ), хелаттаушы агент — этилендиаминтетрасірке қышқылының (ЭДТА), Tween-20, Tween-80, Triton X-100 және натрий додецилсульфаты (НДС) детергенттерінің ферментативті белсенділікке әсері осы реагенттерді реакциялық қоспаға қосу арқылы анықталды. Ферментативті белсенділік 40°C температурада 50 мМ натрий фосфатты буферінде (pH 7,0) анықталды. Металл иондары мен химиялық заттар қосылмаған кездегі белсенділік мәндері 100% деп қабылданды.

Рекомбинантты эстеразаның субстраттық арнайылығын анықтау

Рекомбинантты эстеразалардың субстраттық ерекшелігі ацил тізбегінің ұзындығы әртүрлі (C2–C18) pNP-эфирлерін қолдану арқылы анықталды. Реакция 50 мМ фосфатты буферде (pH 7,0) 40°C температурада 10 минут бойы жүргізілді, әрбір субстраттың концентрациясы 10 мМ тең болды. Субстраттық арнайылықты анықтау үшін келесі субстраттар қолданылды: р-нитрофенилацетат (C2), р-нитрофенилоктаноат (C8) (Thermo Fisher Scientific), р-нитрофенилпальмитат (C16), р-нитрофенилдодеканоат (C12) (Sigma-Aldrich), р-нитрофенилдеканат (C10), р-нитрофенилстеарат (C18) (BLDpharm, Сунцзян, Қытай), р-нитрофенилбутират (C4) (Cauman chemical company, Анн-Арбор, Мичиган, АҚШ), р-нитрофенилмиристат (C14) және р-нитрофенилгексаноат (C6) (Apollo Scientific, Стокпорт, Ұлыбритания).

Рекомбинантты эстеразаның кинетикалық параметрлері мен меншікті белсенділігі

Кинетикалық параметрлер 40°C температурасында және pH 7,0 болатын 50 мМ натрий фосфатты буферінде 0,01–2,00 мМ концентрациядағы р-нитрофенилацетаттың ыдырау ферментативті реакциясы арқылы өлшенді. Михаэлис константасы K_m мен максималды жылдамдық V_{max} мәндері Михаэлис-Ментен теңдеуі [18] бойынша есеп-

телді. K_m константалары мен катализдік жылдамдықты k_{cat} анықтау үшін сызықтық жылдамдық өлшеніп, константалар GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, АҚШ) бағдарламасындағы бірсайтты байланысу моделінің көмегімен анықталды. Меншікті белсенділік оңтайлы жағдайларда, субстрат ретінде р-нитрофенилацетатты қолдану арқылы өлшенді.

Бағдарламалық құралдар, биоинформатика және статистикалық талдау

Аминқышқылдық тізбекті талдау SnapGene Viewer 7.1.1 (Dotmatics, АҚШ) арқылы жүргізілді. Ақуыз тізбегінде секреторлық пептидті анықтау үшін SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) онлайн-платформасы пайдаланылды. Белсенділікті анықтау бойынша барлық тәжірибелер үш рет қайталану негізінде жүргізілді. Ферменттердің белсенділігі туралы деректер тәуелсіз зерттеулерден алынып, орташа мәндер мен стандартты ауытқулар (SD) GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, АҚШ) көмегімен есептелді. Барлық деректер орташа мән $\pm$ SD ($n = 3$) түрінде берілген.

НӘТИЖЕЛЕР МЕН ТАЛДАУ

Бациллалық штаммдар өндірістік маңызы зор әртүрлі ферменттердің көзі болып табылады [19][20]. Эстеразалар микробтық ферменттерді зерттеудің әртүрлі бағыттарында, соның ішінде тамақ өнімдерін өңдеудің заманауи технологияларында, жемістер мен көкөністерден химиялық пестицидтерді жоюда, сондай-ақ опа-далап, химиялық және фармацевтикалық өнеркәсіпте кеңінен сұранысқа ие [21]. Эстеразалардың ішінде GDSL-эстеразалар/липазалар өздерінің бірегей құрылымдық ерекшеліктерімен және катализдік қасиеттерімен зерттеушілердің назарын аударуда, бұл оларды классикалық эстеразалар мен липазалардан ерекшелендіреді. Осындай айрықша белгілердің бірі – консервативті N-терминалды мотив, ол оларды классикалық эстеразалардан/липазалардан ажыратып, SGNH-гидролазалар супертуысына жатқызады. Ферменттер тізбестеріне жасалған толық зерттеулер, құрамында инвариантты аминқышқылдар қалдықтары бар, келесі төрт консервативті тізбек блоктарының бар екенін анықтады: I блоктағы серин, II блоктағы глицин, III блоктағы аспарагин және V блоктағы гистидин [13]. Берілген блоктар жиынтығы субстраттың тиімді гидролизі үшін шешуші маңызы бар жоғары консервативті катализдік орталықты құрайды. Өдеттегі Gly-X-Ser-X-Gly мотивінен тұратын классикалық эстеразалардан/липазалардан айырмашылығы, *Bacillus* эстеразалары көбінесе GLSLG сияқты ірі консервативті пентапептидтің ішіне енгізілген GDSL(N) тетрапептидімен сипатталады [22]. Бұл ферменттердің үшөлшемді құрылымы өзінің құрылымдық тұрақтылығымен және әмбебаптығымен белгілі α/β -гидролазалық қатпармен анықталады. *Bacillus* және соған ұқсас бактериялардағы гомологиялық құрылымдарға негізделген *Bacillus* GDSL(N) эстеразаларын молекулалық модельдеу β -спиральдармен қоршалған орталық β -қатпары анықтайды. Мұндай құрылым катализдік триаданы ұстап тұратын және белсенді орталықтың қалыптасуына әсер ететін тұрақты құрылыс түзеді [13, 22].

Bacillus туысы бактерияларындағы эстеразалар спора түзілу және одан кейінгі споралардың өну процестеріне

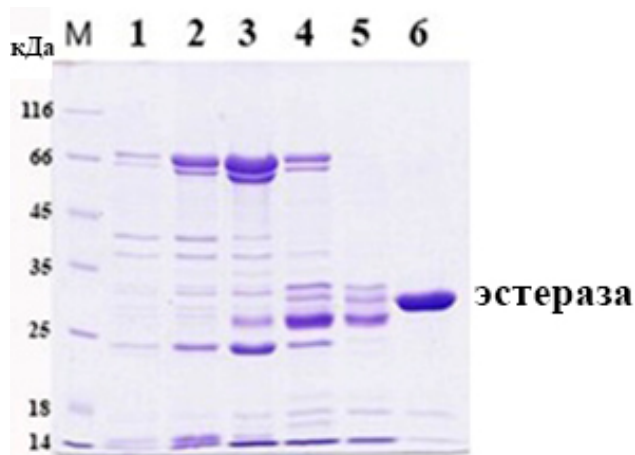
қатысатын маңызды гидролитикалық ферменттер ретінде қарастырылады. *B. subtilis* және *B. cereus* түрлеріне жүргізілген зерттеулер эстеразалық белсенділіктің споруляция кезінде айтарлықтай өзгеретінін және бірнеше изоформалармен ұсынылғанын көрсетті, бұл эстеразаның жасушалық құрылымдардың қайта құрылуына қатыстынын білдіреді [23]. Ақырғы өсу және споралардың қалыптасу кезеңінде протеазалармен қатар эстеразалардың да секрециясы байқалады, бұл ретте дәл осы эстеразалар жасушадан тыс ферменттік экстракттың эстеразалық белсенділігінің негізгі үлесін қамтамасыз етеді [24]. Бұл ферменттер жасуша қабықшасының липидті және күрделі эфирлік қосылыстардың гидролизіне, спораның кортикалық қабатының ремодельденуіне және қор заттарының мобилизациясына қатысады. Сонымен қатар, споралардың өнуі кезінде эстеразалардың белсенуі ерте кезеңдерде-ақ байқалады және споралардың рефрактерлігін жоғалтуымен сәйкес келеді, бұл оларды тыныштық күйден шығудың бастапқы кезеңдерінің маркерлері мен болжамды реттеушілері ретінде қарастыруға мүмкіндік береді [25].

Bacillus paralicheniformis T7 штаммының жасушалары протеазалар мен кератиназаларды өндіретінімен белгілі, бұл құс қауырсыны, мүйіз, тұяқ, тері және ірі қара малдың жүні сияқты кератин құрамды қалдықтарды гидролиздеуге мүмкіндік береді [26]. Протеазалық және кератиназалық белсенділіктерімен қатар, штамм амилолитикалық, коллагеназалық, ксиланазалық, фосфатазалық, фитазалық және эстеразалық белсенділіктерге де ие [14, 27]. Дифко ортасында, Аррет-Киршбаум агарында немесе модификацияланған коректік агарда 5 күн бойы дақылдандыру кезінде *B. paralicheniformis* T7 штаммы 121 °C температураға және 1,1 бар қысымға 20 минут бойы төзімді эндоспоралар түзеді [27]. Штаммды қауырсынды ортада дақылдандыру арқылы алынған *B. paralicheniformis* T7 штаммының секреторлық протеомасын масс-спектрометриялық зерттеу кезінде вегетативті жасушалармен қатар штаммның эндоспоралары бар екені, ал ферменттік экстрактта молекулалық массасы 26,8 кДа болатын эстераза бар екені анықталды [14]. *B. paralicheniformis* T7 геномын талдау нәтижесінде (GenBank CP124861) эстеразаның 1322691-1233403 локусында орналасқаны анықталды. Аминқышқылдық тізбекті талдау *B. paralicheniformis* T7 эстеразасының GDSL(N)-эстеразалар/липазалар туысына жататынын және ақуыздың N-соңына жақын жерде консервативті GDSX мотиві бар екенін көрсетті (1-сурет). I, II, III және V блоктарындағы төрт инвариантты негізгі катализдік аминқышқылды қалдықтар Ser, Gly, Asn және His оның SGNH-гидролазалар супертуысының мүшесі ретіндегі классификациясын растайды. EST-28 үшін серин, аспарат және гистидиннен тұратын катализдік триада I және V блоктарында Ser26-Asp210-His215 позицияларында орналасқан (1-сурет).

Бұған дейін *E. coli* жасушаларында *B. paralicheniformis* T7 рекомбинантты эстеразасы алынып, ол үшін негізгі биохимиялық параметрлері: температуралық және pH оптимумдары, температуралық және pH тұрақтылығы анықталған болатын. Атап айтқанда, *B. paralicheniformis* T7 эстеразасының максималды белсенділігі 40°C және pH 7,0 жағдайында байқалатыны анықталды, ал тер-



Сурет 1. *B. paralicheniformis* Т7 эстеразасының аминқышқылдық тізбегі. Сигналдық пептидтің аминқышқылдық қалдықтары көк түспен белгіленген. Төрт консервативті І, ІІ, ІІІ және V блоктары жақшалармен белгіленген. SGNH орналасу орны қызыл түспен айқындалған. Катализдік триаданың аминқышқылдық қалдықтары: серин (S²⁶), аспарагин қышқылы (D²¹⁰) және гистидин (H²¹⁵) жоғары жағынан жасыл жұлдызшалармен белгіленген



Сурет 2. EST-28 рекомбинантты эстеразасын Ni-NTA-да хроматографиялық тазарту нәтижесі. М – ақуыз маркері (Thermo Scientific, cat. # 26610), 1-6 – сәйкесінше 80, 100, 120, 150, 200, 250 мМ имидазол концентрациясы бар элюаттар

дақылдандыру арқылы биомассасы алынып, лизисы жасалып, металл-афиндік хроматография арқылы рекомбинантты ақуызы бөлініп алынды. Сурет 2-е Ni-NTA қолдана отырып, эстеразаны хроматографиялық тазарту нәтижелері көрсетілген.

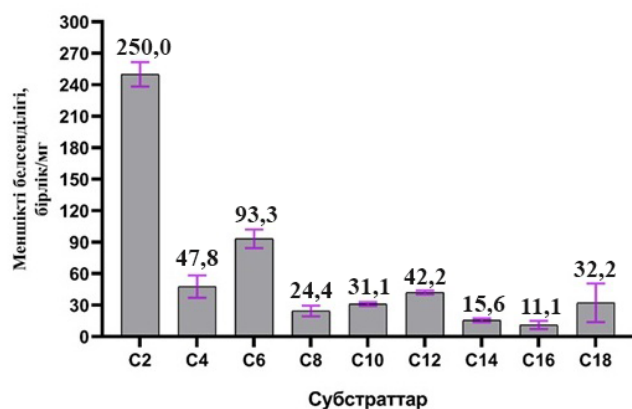
Суреттен көрініп тұрғандай, ақуыздың шығуы 120 мМ имидазол концентрациясында басталады. Ең таза фракция 250 мМ имидазол концентрациясында алынды. Бредфорд әдісімен ақуыз концентрациясын өлшеу арқылы 1 литр индукцияланған дақылдан тазартылған ақуыздың шығысы 2,9 мг құрайтыны анықталды.

Рекомбинантты эстераза белсенділігіне металл иондарының әсері зерттелді, кальциді қосу кезінде рекомбинантты ферменттің эстеразалық белсенділігі 86%-ға төмендегені анықталды (1-кесте). Эстераза сонымен қатар Mg²⁺ иондарына сезімтал болып шықты – магний хлоридін қосу кезінде ферменттің қалдық белсенділігін екі есеге жуық төмендеді. Mn²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ және Fe²⁺ иондары да эстераза белсенділігін тежейді – қалдық белсенділік бақылау деңгейінің үштен бірінен аспайды. ЭДТА қосу эстераздық белсенділікті 2 есе азайтты, ал ДТТ мен β-меркаптоэтанол ферменттің әсерін толық инактивациялады (белсенділігін жойды). Ионды емес Твин-20, Твин-80 және Тритон X-100 детергенттерін қосу эстеразалық белсенділікті 10–54%-ға төмендетті. Фермент натрий додецилсульфатының (ДСН) әсеріне жақсы төзімділік көр-

8,0-10,0 жағдайында 15 минуттық инкубацияға төзімді екенін көрсетті [15]. Берілген зерттеуде металл иондары мен детергенттердің рекомбинантты ферменттің белсенділігіне әсері, эстеразаның субстраттық арнайылығы зерттелді және кинетикалық параметрлері анықталды. Рекомбинантты эстеразаны өндіруші-штаммы ИПТГ-мен

Кесте 1. Металл иондары мен детергенттердің рекомбинантты эстеразаның қалдық белсенділігіне әсері

Қосынды зат	Концентрациясы	Қалдық белсенділік, %	Қосынды зат	Концентрациясы	Қалдық белсенділік, %
Бақылау	-	100 ± 1	ЭДТА	10 мМ	54,5 ± 0,7
CaCl ₂	10 мМ	14 ± 1	ДТТ	10 мМ	0
MgCl ₂	10 мМ	52,3 ± 0,5	β-Mercaptoethanol	10 мМ	0
MnCl ₂	10 мМ	37,7 ± 0,6	Tween-20	0,1%	80,0 ± 0,6
CuCl ₂	10 мМ	32,7 ± 0,5	Tween-80	0,1%	74 ± 0,6
ZnCl ₂	10 мМ	33 ± 3	Triton X-100	0,1%	46 ± 2
FeSO ₄	10 мМ	34 ± 3	ДСН	0,1%	89 ± 3



Сурет 3. Рекombинантты эстеразаның субстраттық арнайылығы

сетті – ДСН қосу эстераздық белсенділікті тек 11%-ға ғана азайтады.

Жалпы жүргізілген тәжірбиелер эстеразаның қос валентті иондарға сезімтал екенін көрсетті, олар негізінен ферменттің белсенділігін төмендетті (2-кесте). Тотықсыздандырғыш агенттерді қосу кезінде эстеразалық белсенділік толықтай тежелді, дегенмен фермент Tween-20, Tween-80 және Triton X-100 сияқты ионды емес детергенттерге төзімділік көрсетті. Эстеразаның жасушадан тыс (экстрацеллюлярлық) фермент екенін ескерсек, оның детергенттер мен тежеуіштерге (ДТТ және β -меркаптоэтанолды қоспағанда) салыстырмалы түрде төзімділігі эстеразаның жасушадан тыс локализациясымен түсіндірілуі мүмкін. Салыстырмалы түрде айта кететін жайт, Cu^{2+} және Fe^{2+} иондарының тежегіш әсері бұған дейін *B. subtilis* DR8806 эстеразасы үшін де анықталған болатын [28], сонымен бірге аталған фермент 1% Triton X-100 төзімділік көрсеткен [28].

Рекombинантты эстеразаның субстраттық арнайылығы C2 (pNP-ацетат) бастап C18 (pNP-стеарат) дейінгі р-нитрофенил туындыларын қолдану арқылы зерттелді. Сурет 3 барлық 9 субстрат үшін эстеразалық белсенділіктің мәндері келтірілген.

Суреттен көрініп тұрғандай, ең жоғары белсенділік р-нитрофенилацетат (C2) үшін байқалды – $250,0 \pm 0,1$

бірлік/мг, ал ең төменгі көрсеткіш р-нитрофенилпальмитат (C16) үшін тіркелді – $11,1 \pm 0,1$ бірлік/мг. Бациллалық эстеразалар үшін көмірсутек тізбегі қысқа май қышқылдарының күрделі эфирлері субстрат болып табылатыны белгілі [29]. Субстраттық арнайылық бойынша жүргізілген тәжірбиелер нәтижелері *B. paralicheniformis* T7 эстеразасының қысқа тізбекті субстраттарға (C2-C6) тән екенін және липазалық белсенділігі жоқ «шынайы эстераза» болып табылатынын айқын көрсетті. Басқа *Bacillus* штамдарынан алынған ұқсас ферменттерге жасалған салыстырмалы талдаулар, тізбектегі көміртек атомдарының санына байланысты бациллалық эстеразалар үшін қолайлы субстраттар ацетаттар (C2) [12, 28, 30-34] немесе бутираттар (C4) [31, 32, 35, 36] екенін айқындады.

Рекombинантты ферменттің кинетикалық параметрлерін анықтау барысында р-нитрофенилацетатты қолданғанда эстераза үшін Михаэлис константасы K_m 26,18 мМ, ал V_{max} мәні 52,37 бірлік/мг құрайтыны анықталды. Катализдік жылдамдықтың k_{cat} мәні 1,74 с-1 құрады. V_{max} және K_m көрсеткіштерін салыстырмалы талдау бациллалық эстеразалар үшін максималды реакция жылдамдығының айтарлықтай ауытқитынын көрсетеді: *Bacillus* sp. JR3 ферменті үшін 0,22 бірлік/мг-нан [36] *B. subtilis* DSM402 эстеразасы үшін 1449 бірлік/мг-ға дейін (2-кесте) [34]. *Bacillus* эстеразалары субстратқа жоғары аффинділікпен сипатталады, бұған K_m төмен мәндері дәлел болады (2-кесте). Бұл *B. paralicheniformis* T7 эстеразасына максималды реакция жылдамдығына жету үшін көбірек субстрат қажет екенін болжауға мүмкіндік береді.

Осылайша, *B. paralicheniformis* T7 эстеразасының субстраттық арнайылығы мен ферменттің кинетикалық константалары анықталып, металл иондарының, хелаттаушы агенттің, тотықсыздандырғыш агенттердің, ионды және ионды емес детергенттердің рекombинантты эстеразаның белсенділігіне әсері зерттелді. *B. paralicheniformis* T7 эстеразасының қысқа тізбекті май қышқылдарына тән ерекшелігін ескерсек, бұл фермент парфюмерия мен тамақ өнеркәсібінде хош иістендіргіштер ретінде қолданылатын сірке және май қышқылдарының күрделі эфирлерінің биокатализдік синтезі технологияларында үлкен мүмкіндіктерге ие.

Кесте 2. Бациллалық эстеразалардың кинетикалық параметрлері

Штамм	V_{max} , бірлік/мг	K_m , мМ	Субстрат	Сілтеме
<i>B. paralicheniformis</i> T7	52,4	26,2	pNP ацетат (C2)	Это исследование
<i>B. subtilis</i> DR8806	151	4,2	pNP ацетат (C2)	[28]
<i>B. pumilus</i>	49,02	3,94	pNP ацетат (C2)	[30]
<i>B. licheniformis</i>	63,04	2,11	pNP ацетат (C2)	[31]
<i>Bacillus</i> sp. K91	277,78	0,42	pNP ацетат (C2)	[32]
<i>B. velezensis</i> SYBC H47	2,63	0,68	pNP ацетат (C2)	[33]
<i>Bacillus</i> sp. HR21-6	13,6	1,7	pNP ацетат (C2)	[12]
<i>B. subtilis</i> DSM402 (BS2)	1449	119	pNP ацетат (C2)	[34]
<i>Bacillus</i> sp. 4	833,33	0,063	pNP бутират (C4)	[35]
<i>B. licheniformis</i>	22,76	1,38	pNP бутират (C4)	[31]
<i>Bacillus</i> sp. K91	17,86	0,48	pNP бутират (C4)	[32]
<i>Bacillus</i> sp. JR3	0,22	1,7	pNP бутират (C4)	[36]

ҚОРЫТЫНДЫ

Осы зерттеу барысында *B. paralicheniformis* T7 штаммынан рекомбинантты эстеразасы алынып, биохимиялық жағынан сипатталды. Ферменттің GDSL-эстеразалар туысына жататыны және күрделі эфирлердің гидролизін қамтамасыз ететін Ser26-Asp210-His215 катализдік триадасына ие екені көрсетілді. Зерттелген эстеразаның қысқа тізбекті субстраттарға (C2-C6) қатысты ең жоғары белсенділік танытатыны анықталды, бұл оның «шынайы эстеразаларға» жататынын растайды. Фермент қос валентті металл иондарының әсеріне сезімтал және тотықсыздандырғыш агенттермен толық тежеледі, бұл катализдік белсенділікті сақтауда дисульфидті байланыстар мен ақуыздың құрылымдық ұйымдасуының маңызды рөлін көрсетеді. Сонымен қатар, ферменттің ионды емес детергенттер мен анионды беткейлік белсенді заттардың әсеріне салыстырмалы түрде төзімділігі анықталды, бұл өнеркәсіптік қолданысы үшін маңызды қасиет болып табылады. Ферменттің кинетикалық параметрлері оның орташа катализдік тиімділігін және субстратқа салыстырмалы түрде төмен аффинділігін көрсетеді, бұл GDSL-эстеразалардың белсенді орталығы құрылымының ерекшеліктерімен байланысты. Алынған деректер жиынтығы *B. paralicheniformis* T7 эстеразасын қысқа тізбекті май қышқылдарының күрделі эфирлерін синтездеуге арналған келешегі зор биокатализатор ретінде қарастыруға мүмкіндік береді. Жұмыстың практикалық маңыздылығы аталған ферментті биотехнологиялық үрдістерде, соның ішінде хош иісті қосылыстар алуда, тамақ, химия және фармацевтика өнеркәсібіне арналған ферменттік препараттарды әзірлеуде қолдану мүмкіндігінде жатыр.

ҚАРЖЫЛАНДЫРУ

Зерттеулер Қазақстан Республикасының ғылым және жоғарғы білім Министрлігінің ғылыми Комитетінің қаржыландыру аясында өткізілді (грант № AP23488270).

АВТОРЛАРДЫҢ ҮЛЕСІ

Тұжырымдама жасау, Х.Б.; методология, М.А., А.М.; статистикалық талдау, А.М., А.Ж.; зерттеу дизайны, Х.Б., М.А.; деректерді интерпретациялау, Х.Б., А.Ж.; мәтіннің алғашқы нұсқасын дайындау, Х.Б.; мәтінді рецензиялау және редакциялау, А.Ж., А.М.; ғылыми жетекшілік, Х.Б. Барлық авторлар қолжазбаның жарияланған нұсқасымен танысып, оны мақұлдады.

ҚЫЗЫҒУШЫЛЫҚТАРДЫҢ ҚАҚТЫҒЫСЫ

Барлық авторлардың атынан жауапты автор мүдделер қатығысының жоқ екенін ресми түрде мәлімдейді.

ҚОЛДАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1. Castro F. F., Pinheiro A. B. P., Gerhardt E. C. M., Oliveira M. A. S., Barbosa-Tessmann I. P. Production, purification, and characterization of a novel serine esterase from *Aspergillus westerdijkiae*. // *Journal of Basic Microbiology*. - 2018. - Vol. 58, - No 2, - P. 131-143. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700509>
2. Mussakhmetov A., Silayev D. Esterases:

mechanisms of action, biological functions, and application prospects. // *Journal of Applied Microbiology*. - 2025. - Vol. 5, - P.139. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol5040139>

3. W. Seok-Jae, J. Han Byeol, K. Hyung Kwoun et al. Characterization of Novel Salt-Tolerant Esterase Isolated from the Marine Bacterium *Alteromonas* sp. 39-G1. // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. - 2020. - Vol. 30, - No 2, - P. 216-225. <https://doi.org/10.4014/jmb.1907.07057>

4. Soumya P., Kochupurackal J. An Esterase with Increased Acetone Tolerance from *Bacillus subtilis* E9 over Expressed in *E. coli* BL21 Using pTac Bs-est Vector. // *Molecular Biotechnology*. - 2022. - Vol. 64, - No 7. - P. 814-824. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00458-4>

5. Chahinian H., Sarda L. Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. // *Protein Pept Lett.* - 2009. - Vol. 16, - No 10. - P. 1149-61. <https://doi.org/10.2174/092986609789071333>

6. Zhang M., Lai W., Zhu Y., Chen S., Zhou K., Ao X., He L., Yang Y., Zou L., Liu A., Yao K., Liu S. Purification and characterization of a novel cypermethrin-hydrolyzing esterase from *Bacillus licheniformis* B-1. // *Journal of Food Science*. - 2021. - Vol. 86, - No 4. - P. 1475-1487. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15662>

7. Yu N., Yang J.-c., Yin G.-t., Li R.-s., Zou W.-t., He C. Identification and characterization of a novel esterase from *Thauera* sp. // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. - 2018. - Vol. 65, - No 5. - P. 748-755. <https://doi.org/10.1002/bab.1659>

8. Noby N., Hussein A., Saeed H., Embaby A. M. "Recombinant cold -adapted halotolerant, organic solvent-stable esterase (estHIJ) from *Bacillus halodurans*. // *Analytical Biochemistry*. - 2020. - Vol. 591. - P. 113554. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113554>

9. Gall M. G., Nobili A., Pavlidis I. V., Bornscheuer U. T. Improved thermostability of a *Bacillus subtilis* esterase by domain exchange. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. - 2014. - Vol. 98, - No 4. - P. 1719-1726. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5053-0>

10. Barzkar N., Sohail M., Tamadoni Jahromi S., Gozari M., Poormozaffar S., Nahavandi R., Hafezieh M. Marine Bacterial Esterases: Emerging Biocatalysts for Industrial Applications. // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. - 2021. - Vol. 193, - No 4. - P. 1187-1214. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03483-8>

11. Ameri A., Shakibaie M., Faramarzi M. A., Ameri A., Amirpour-Rostami S., Rahimi H. R., Forootanfar H. Thermoalkalophilic lipase from an extremely halophilic bacterial strain *Bacillus atrophaeus* FSHM2: Purification, biochemical characterization and application. // *Biocatalysis and Biotransformation*. - 2017. - Vol. 35, - No 3. - P. 151-160. <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1308494>

12. Sánchez-Barrionuevo L., Mateos J., Fernández-Puente P., Begines P., Fernández-Bolaños J. G., Gutiérrez G., Cánovas D., Mellado E. Identification of an acetyl esterase in the supernatant of the environmental strain *Bacillus* sp. HR21-6. // *Biochimie*. - 2022. - Vol. 198. - P. 48-59. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.03.004>

13. Ding J., Yu T., Liang L., Xie Z., Yang Y., Zhou J., Xu B., Li J., Huang Z. Biochemical characterization of a GDSL-motif esterase from *Bacillus* sp. K91 with a new putative catalytic mechanism. // *J Microbiol Biotechnol.* - 2014. - Vol. 24, - No 11. - P. 1551-8. <https://doi.org/10.4014/jmb.1406.06056>
14. Aktayeva S., Khasenov B. High keratinase and other types of hydrolase activity of the new strain of *Bacillus paralicheniformis*. // *PLOS ONE.* - 2024. - Vol. 19, - No 10. - P. e0312679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0312679>
15. Mussakhmetov A., Astrakhanov M., Aktayeva S., Silayev D., Khasenov B. Cloning of the bacterial esterase gene and determination of the biochemical characteristics of the recombinant enzyme. Eurasian // *Journal of Applied Biotechnology.* - 2025. - No 3. - P. 147-155. <https://doi.org/10.11134/btp.3.2025.16>
16. Zhao J., Ma M., Yan X., Zhang G., Xia J., Zeng G., Tian W., Bao X., Zeng Z., Yu P., Gong D. Expression and characterization of a novel lipase from *Bacillus licheniformis* NCU CS-5 for application in enhancing fatty acids flavor release for low-fat cheeses. // *Food Chem.* - 2022. - Vol. 368. - P. 130868. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130868>
17. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // *Anal Biochem.* - 1976. - Vol. 72. - P. 248-54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
18. Doran P. M. Chapter 12 - Homogeneous Reactions. // *Bioprocess Engineering Principles* (Second Edition). London: Academic Press, - 2013. - P. 599-703.
19. Katsimpouras C., Stephanopoulos G. Enzymes in biotechnology: Critical platform technologies for bioprocess development. // *Curr Opin Biotechnol.* - 2021. - Vol. 69. - P. 91-102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.003>
20. Chandra P., Enespa, Singh R., Arora P. K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. // *Microb Cell Fact.* - 2020. - Vol. 19, - No 1. - P. 169. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>
21. Ng A. M. J., Zhang H., Nguyen G. K. T. Zymography for Picogram Detection of Lipase and Esterase Activities. // *Molecules.* - 2021. - Vol. 26, - No 6. - P. 1542. <https://doi.org/10.3390/molecules26061542>
22. Kovacic F., Babic N., Krauss U., Jaeger K.-E. Classification of Lipolytic Enzymes from Bacteria. Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids. // *Rojo F. Cham: Springer International Publishing.* - 2019. - P. 255-289. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5_39-1
23. Baillie A., Norris J. R. Studies of Enzyme Changes During Sporulation in *Bacillus cereus*, Using Starch Gel Electrophoresis. *Journal of Applied Bacteriology.* - 1963. - Vol. 26, - No 1. - P. 102-106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1963.tb01163.x>
24. Millet J. Characterization of Proteinases Excreted by *Bacillus subtilis* Marburg Strain during Sporulation. // *Journal of Applied Bacteriology.* - 1970. - Vol. 33, - No 1. - P. 207-219.
25. Ferencik L., Cote M. A., Rotman B. Esterase activity as a novel parameter of spore germination in *Bacillus anthracis*. // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2004. - Vol. 319, - No 3. - P. 854-8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.062>
26. Aktayeva S., Khasenov B. New *Bacillus paralicheniformis* strain with high proteolytic and keratinolytic activity. // *Sci Rep.* - 2024. - Vol. 14, - No 1. - P. 22621. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-73468-8>
27. Mussakhmetov A., Aktayeva S., Sarsen A., Daniyarov A., Khasenov B., Kairov U. Whole-genome sequence and assembly of the sporogenic *Bacillus paralicheniformis* T7 strain with high proteolytic and amylolytic activities. // *Front Genet.* - 2026. - Vol. 17. - P. 1720096. <https://doi.org/10.3389/fgene.2026.1720096>
28. Asoodeh A., Ghanbari T. Characterization of an extracellular thermophilic alkaline esterase produced by *Bacillus subtilis* DR8806. // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* - 2013. - Vol. 85-86. - P. 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.08.013>
29. Kumar A., Dhar K., Kanwar S. S., Arora P. K. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. // *Biological Procedures Online.* - 2016. - Vol. 18, - No 1. - P. 2. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0033-2>
30. Sharma T., Kanwar S., Sharma A. Purification and Characterization of an Extracellular High Molecular Mass Esterase from *Bacillus pumilus*. // *Journal of Advanced Biotechnology and Bioengineering.* - 2016. - Vol. 4. 10.12970/2311-1755.2016.04.01.2
31. Zhang W., Xu H., Wu Y., Zeng J., Guo Z., Wang L., Shen C., Qiao D., Cao Y. A new cold-adapted, alkali-stable and highly salt-tolerant esterase from *Bacillus licheniformis*. // *International Journal of Biological Macromolecules.* - 2018. - Vol. 111. - P. 1183-1193. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.152>
32. Tingting Y., Junmei D., Qingxia Z., Nanyu H., Jialin Y., Yunjuan Y., Junjun L., Yuelin M., Qian W. Identification and Characterization of a New Alkaline SGNH Hydrolase from a Thermophilic Bacterium *Bacillus* sp. K91. // *Journal of Microbiology and Biotechnology.* - 2016. - Vol. 26, - No 4. - P. 730-738. <https://doi.org/10.4014/jmb.1507.07101>
33. Huang L., Meng D., Tian Q., Yang S., Deng H., Guan Z., Cai Y., Liao X. Characterization of a novel carboxylesterase from *Bacillus velezensis* SYBC H47 and its application in degradation of phthalate esters. // *Journal of Bioscience and Bioengineering.* - 2020. - Vol. 129, - No 5. - P. 588-594. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.11.002>
34. Schmidt M., Henke E., Heinze B., Kourist R., Hidalgo A., Bornscheuer U. T. A versatile esterase from *Bacillus subtilis*: cloning, expression, characterization, and its application in biocatalysis. // *Biotechnol J.* - 2007. - Vol. 2, - No 2. - P. 249-53. <https://doi.org/10.1002/biot.200600174>
35. Ateslier Z. B. B., Metin K. Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus* sp. // *Enzyme and Microbial Technology.* - 2006. - Vol. 38, - No 5. - P. 628-635. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.07.015>
36. Ribera J., Estupiñán M., Fuentes A., Fillat A., Martínez J., Diaz P. *Bacillus* sp. JR3 esterase LipJ: A new mesophilic enzyme showing traces of a thermophilic past. // *PLOS ONE.* - 2017. - Vol. 12, - No 7. - P. e0181029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181029>

doi.org/10.1371/journal.pone.0181029

REFERENCES

1. Castro F. F., Pinheiro A. B. P., Gerhardt E. C. M., Oliveira M. A. S., Barbosa-Tessmann I. P. Production, purification, and characterization of a novel serine-esterase from *Aspergillus westerdijkiae*. // *Journal of Basic Microbiology*. - 2018. - Vol. 58, - No 2, - P. 131-143. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700509>
2. Mussakhmetov A., Silayev D. Esterases: mechanisms of action, biological functions, and application prospects. // *Journal of Applied Microbiology*. - 2025. - Vol. 5, - P.139. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol5040139>
3. W. Seok-Jae, J. Han Byeol, K. Hyung Kwoun et al. Characterization of Novel Salt-Tolerant Esterase Isolated from the Marine Bacterium *Alteromonas* sp. 39-G1. // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. - 2020. - Vol. 30, - No 2, - P. 216-225. <https://doi.org/10.4014/jmb.1907.07057>
4. Soumya P., Kochupurackal J. An Esterase with Increased Acetone Tolerance from *Bacillus subtilis* E9 over Expressed in *E. coli* BL21 Using pTac Bs-est Vector. // *Molecular Biotechnology*. - 2022. - Vol. 64, - No 7. - P. 814-824. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00458-4>
5. Chahinian H., Sarda L. Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. // *Protein Pept Lett.* - 2009. - Vol. 16, - No 10. - P. 1149-61. <https://doi.org/10.2174/092986609789071333>
6. Zhang M., Lai W., Zhu Y., Chen S., Zhou K., Ao X., He L., Yang Y., Zou L., Liu A., Yao K., Liu S. Purification and characterization of a novel cypermethrin-hydrolyzing esterase from *Bacillus licheniformis* B-1. // *Journal of Food Science*. - 2021. - Vol. 86, - No 4. - P. 1475-1487. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15662>
7. Yu N., Yang J.-c., Yin G.-t., Li R.-s., Zou W.-t., He C. Identification and characterization of a novel esterase from *Thauera* sp. // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. - 2018. - Vol. 65, - No 5. - P. 748-755. <https://doi.org/10.1002/bab.1659>
8. Noby N., Hussein A., Saeed H., Embaby A. M. "Recombinant cold -adapted halotolerant, organic solvent-stable esterase (estHIJ) from *Bacillus halodurans*". // *Analytical Biochemistry*. - 2020. - Vol. 591. - P. 113554. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113554>
9. Gall M. G., Nobili A., Pavlidis I. V., Bornscheuer U. T. Improved thermostability of a *Bacillus subtilis* esterase by domain exchange. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. - 2014. - Vol. 98, - No 4. - P. 1719-1726. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5053-0>
10. Barzkar N., Sohail M., Tamadoni Jahromi S., Gozari M., Poormozaffar S., Nahavandi R., Hafezieh M. Marine Bacterial Esterases: Emerging Biocatalysts for Industrial Applications. // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. - 2021. - Vol. 193, - No 4. - P. 1187-1214. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03483-8>
11. Ameri A., Shakibaie M., Faramarzi M. A., Ameri A., Amirpour-Rostami S., Rahimi H. R., Forootanfar H. Thermoalkalophilic lipase from an extremely halophilic bacterial strain *Bacillus atrophaeus* FSHM2: Purification, biochemical characterization and application. // *Biocatalysis and Biotransformation*. - 2017. - Vol. 35, - No 3. - P. 151-160. <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1308494>
12. Sánchez-Barrionuevo L., Mateos J., Fernández-Puente P., Begines P., Fernández-Bolaños J. G., Gutiérrez G., Cánovas D., Mellado E. Identification of an acetyl esterase in the supernatant of the environmental strain *Bacillus* sp. HR21-6. // *Biochimie*. - 2022. - Vol. 198. - P. 48-59. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.03.004>
13. Ding J., Yu T., Liang L., Xie Z., Yang Y., Zhou J., Xu B., Li J., Huang Z. Biochemical characterization of a GDSL-motif esterase from *Bacillus* sp. K91 with a new putative catalytic mechanism. // *J Microbiol Biotechnol*. - 2014. - Vol. 24, - No 11. - P. 1551-8. <https://doi.org/10.4014/jmb.1406.06056>
14. Aktayeva S., Khassenov B. High keratinase and other types of hydrolase activity of the new strain of *Bacillus paralicheniformis*. // *PLOS ONE*. - 2024. - Vol. 19, - No 10. - P. e0312679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0312679>
15. Mussakhmetov A., Astrakhanov M., Aktayeva S., Silayev D., Khassenov B. Cloning of the bacterial esterase gene and determination of the biochemical characteristics of the recombinant enzyme. Eurasian // *Journal of Applied Biotechnology*. - 2025. - No 3. - P. 147-155. <https://doi.org/10.11134/btp.3.2025.16>
16. Zhao J., Ma M., Yan X., Zhang G., Xia J., Zeng G., Tian W., Bao X., Zeng Z., Yu P., Gong D. Expression and characterization of a novel lipase from *Bacillus licheniformis* NCU CS-5 for application in enhancing fatty acids flavor release for low-fat cheeses. // *Food Chem*. - 2022. - Vol. 368. - P. 130868. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130868>
17. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // *Anal Biochem*. - 1976. - Vol. 72. - P. 248-54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
18. Doran P. M. Chapter 12 - Homogeneous Reactions. // *Bioprocess Engineering Principles* (Second Edition). London: Academic Press, - 2013. - P. 599-703.
19. Katsimpouras C., Stephanopoulos G. Enzymes in biotechnology: Critical platform technologies for bioprocess development. // *Curr Opin Biotechnol*. - 2021. - Vol. 69. - P. 91-102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.003>
20. Chandra P., Enespa, Singh R., Arora P. K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. // *Microb Cell Fact*. - 2020. - Vol. 19, - No 1. - P. 169. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>
21. Ng A. M. J., Zhang H., Nguyen G. K. T. Zymography for Picogram Detection of Lipase and Esterase Activities. // *Molecules*. - 2021. - Vol. 26, - No 6. - P. 1542. <https://doi.org/10.3390/molecules26061542>
22. Kovacic F., Babic N., Krauss U., Jaeger K.-E. Classification of Lipolytic Enzymes from Bacteria. Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids. // *Rojo F. Cham: Springer International Publishing*, - 2019. - P. 255-289. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5_39-1
23. Baillie A., Norris J. R. Studies of Enzyme Changes

During Sporulation in *Bacillus cereus*, Using Starch Gel Electrophoresis. *Journal of Applied Bacteriology*. - 1963. - Vol. 26, - No 1. - P. 102-106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1963.tb01163.x>

24. Millet J. Characterization of Proteinases Excreted by *Bacillus subtilis* Marburg Strain during Sporulation. // *Journal of Applied Bacteriology*. - 1970. - Vol. 33, - No 1. - P. 207-219.

25. Ferencik L., Cote M. A., Rotman B. Esterase activity as a novel parameter of spore germination in *Bacillus anthracis*. // *Biochem Biophys Res Commun*. - 2004. - Vol. 319, - No 3. - P. 854-8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.062>

26. Aktayeva S., Khassenov B. New *Bacillus paralicheniformis* strain with high proteolytic and keratinolytic activity. // *Sci Rep*. - 2024. - Vol. 14, - No 1. - P. 22621. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-73468-8>

27. Mussakhmetov A., Aktayeva S., Sarsen A., Daniyarov A., Khassenov B., Kairov U. Whole-genome sequence and assembly of the sporogenic *Bacillus paralicheniformis* T7 strain with high proteolytic and amylolytic activities. // *Front Genet*. - 2026. - Vol. 17. - P. 1720096. <https://doi.org/10.3389/fgene.2026.1720096>

28. Asodeh A., Ghanbari T. Characterization of an extracellular thermophilic alkaline esterase produced by *Bacillus subtilis* DR8806. // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. - 2013. - Vol. 85-86. - P. 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.08.013>

29. Kumar A., Dhar K., Kanwar S. S., Arora P. K. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. // *Biological Procedures Online*. - 2016. - Vol. 18, - No 1. - P. 2. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0033-2>

30. Sharma T., Kanwar S., Sharma A. Purification and Characterization of an Extracellular High Molecular Mass Esterase from *Bacillus pumilus*. // *Journal of Advanced*

Biotechnology and Bioengineering. - 2016. - Vol. 4. 10.12970/2311-1755.2016.04.01.2

31. Zhang W., Xu H., Wu Y., Zeng J., Guo Z., Wang L., Shen C., Qiao D., Cao Y. A new cold-adapted, alkali-stable and highly salt-tolerant esterase from *Bacillus licheniformis*. // *International Journal of Biological Macromolecules*. - 2018. - Vol. 111. - P. 1183-1193. 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.152

32. Tingting Y., Junmei D., Qingxia Z., Nanyu H., Jialin Y., Yunjuan Y., Junjun L., Yuelin M., Qian W. Identification and Characterization of a New Alkaline SGNH Hydrolase from a Thermophilic Bacterium *Bacillus* sp. K91. // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. - 2016. - Vol. 26, - No 4. - P. 730-738. <https://doi.org/10.4014/jmb.1507.07101>

33. Huang L., Meng D., Tian Q., Yang S., Deng H., Guan Z., Cai Y., Liao X. Characterization of a novel carboxylesterase from *Bacillus velezensis* SYBC H47 and its application in degradation of phthalate esters. // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. - 2020. - Vol. 129, - No 5. - P. 588-594. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.11.002>

34. Schmidt M., Henke E., Heinze B., Kourist R., Hidalgo A., Bornscheuer U. T. A versatile esterase from *Bacillus subtilis*: cloning, expression, characterization, and its application in biocatalysis. // *Biotechnol J*. - 2007. - Vol. 2, - No 2. - P. 249-53. <https://doi.org/10.1002/biot.200600174>

35. Ateşlier Z. B. B., Metin K. Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus* sp. // *Enzyme and Microbial Technology*. - 2006. - Vol. 38, - No 5. - P. 628-635. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.07.015>

36. Ribera J., Estupiñán M., Fuentes A., Fillat A., Martínez J., Diaz P. *Bacillus* sp. JR3 esterase LipJ: A new mesophilic enzyme showing traces of a thermophilic past. // *PLOS ONE*. - 2017. - Vol. 12, - No 7. - P. e0181029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181029>

УДК 577.15

ИЗУЧЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ И КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ЭСТЕРАЗЫ ИЗ СПОРОГЕННОГО ШТАММА *BACILLUS PARALICHENIFORMIS* T7Мусахметов А.^{1,2,3}, Астраханов М.¹, Акишев Ж.^{1,3}, Хасенов Б.^{1,3*}¹ ТОО «Национальный центр биотехнологии. Коргалжынское шоссе 13/5, Астана, 010000.² НАО «Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева». ул. Сатпаева, 2, Астана, 010000.³ ТОО «GenLab». ул. М.Габдуллина, 19/1, Астана, 010000.

*khassenov@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Эстеразы представляют собой важный класс гидролазных ферментов, широко используемых в биотехнологии благодаря их высокой каталитической активности, субстратной специфичности и устойчивости к различным физико-химическим факторам. Спорогенный штамм *Bacillus paralicheniformis* T7 продуцирует внеклеточные ферменты, включая эстеразу, которые связаны с процессами спорообразования и адаптации к стрессовым условиям. В данной работе проведено исследование субстратной специфичности и каталитических свойств рекомбинантной эстеразы из спорогенного штамма *B. paralicheniformis* T7, полученной в клетках *Escherichia coli*. Структурный анализ показал, что эстераза относится к семейству GDSL/SGNH-гидролаз и содержит консервативную каталитическую триаду Ser–Asp–His. Анализ субстратной специфичности с использованием р-нитрофениловых эфиров (C2–C18) показал, что фермент проявляет максимальную активность в отношении короткоцепочечных субстратов, в частности р-нитрофенилацетата ($250,0 \pm 0,1$ Ед/мг), что позволяет отнести его к истинным эстеразам. Исследование влияния различных факторов показало, что двухвалентные ионы металлов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} ингибируют активность фермента, а редуцирующие агенты DTT и β-меркаптоэтанол полностью подавляют его каталитическую функцию. В то же время фермент проявляет относительную устойчивость к неионогенным детергентам и додецилсульфату натрия. Кинетический анализ показал, что значение K_m для р-нитрофенилацетата составляет 26,18 мМ, $V_{\max}$ – 52,37 Ед/мг, а каталитическая константа k_{cat} – $1,74 \text{ c}^{-1}$. Полученные результаты свидетельствуют о выраженной аффинности фермента к субстрату и его умеренной каталитической эффективности по сравнению с другими бациллярными эстеразами. Таким образом, эстераза из *B. paralicheniformis* T7 характеризуется выраженной специфичностью к короткоцепочечным эфирам и устойчивостью к ряду поверхностно-активных веществ, что определяет её перспективность для применения в биокаталитическом синтезе сложных эфиров, используемых в пищевой и парфюмерной промышленности.

Ключевые слова: Эстераза, Эндоспора, Субстрат, Активность, *Bacillus*

UDC 577.15

INVESTIGATION OF SUBSTRATE SPECIFICITY AND KINETIC PARAMETERS OF ESTERASE FROM THE SPOROGENIC STRAIN *BACILLUS PARALICHENIFORMIS* T7Mussakhmetov A.^{1,2,3}, Astrakhanov M.¹, Akishev Z.^{1,3}, Khassenov B.^{1,3*}¹ «National Center for Biotechnology» LLP, 13/5 Korgalzhyn Road, Astana, 010000.² «L.N. Gumilyov Eurasian National University» NJSC. 2 Satbaev st., Astana 010000.³ «GenLab» LLP, 19/1 M. Gabdullin Street, Astana 010000.

*khassenov@biocenter.kz

ABSTRACT

Esterases represent an important class of hydrolase enzymes widely utilized in biotechnology due to their high catalytic activity, substrate specificity, and stability against various physico-chemical factors. The sporogenic strain *Bacillus paralicheniformis* T7 produces extracellular enzymes, including esterase, which are associated with sporulation processes and adaptation to stressful conditions. In this study, the substrate specificity and catalytic properties of a recombinant esterase from the sporogenic strain *B. paralicheniformis* T7, expressed in *Escherichia coli* cells, were investigated. Structural analysis revealed that the esterase belongs to the GDSL/SGNH-hydrolase family and contains a conserved Ser–Asp–His catalytic triad. Substrate specificity analysis using p-nitrophenyl esters (C2–C18) showed that the enzyme exhibits maximum activity toward short-chain substrates, specifically p-nitrophenyl acetate (250.0 ± 0.1 U/mg), classifying it as a true esterase. The study of various factors demonstrated that divalent metal ions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} inhibit enzyme activity, while the reducing agents DTT and β-mercaptoethanol completely suppress its catalytic function. At the same time, the enzyme shows relative stability toward non-ionic detergents and sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic analysis revealed that the K_m value for p-nitrophenyl acetate is 26.18 mM, $V_{\max}$ is 52.37 U/mg, and the catalytic constant k_{cat} is 1.74 s^{-1} . The results indicate a distinct affinity of the enzyme for the substrate and moderate catalytic efficiency compared to other bacillar esterases. Thus, the esterase from *B. paralicheniformis* T7 is characterized by a pronounced specificity for short-chain esters and resistance to a range of surfactants, determining its potential for application in the biocatalytic synthesis of esters used in the food and fragrance industries.

Keywords: Esterase; Endospore; Substrate; Activity; *Bacillus*.