

БАКТЕРИАЛДЫ ЭСТЕРАЗА ГЕНІН КЛОНДАУ ЖӘНЕ РЕКОМБИНАНТТЫ ФЕРМЕНТТІҢ БИОХИМИЯЛЫҚ СИПАТТАМАЛАРЫН АНЫҚТАУ

Мусахметов А.^{1,2}, Астраханов М.¹, Актаева С.^{1,2}, Силаев Д.¹, Хасенов Б.^{1,2*}¹ Ұлттық биотехнология орталығы ЖШС, Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана қ., 010000.² «GenLab» ЖШС, М.Габдуллина к., 19/1. Казахстан, Астана, 010000.

*khassenov@biocenter.kz

ТҮЙІН

Эстеразалар қысқа тізбекті май қышқылдарының трансэтерификациясы мен гидролизін катализдейтін гидролитикалық ферменттер. Эстеразалар табиғатта кеңінен таралған ферменттер, олар өсімдіктерде, жануарларда және микроорганизмдерде кездеседі. Микробиальді эстеразалар биоотын дайындауда, косметикалық, тағам, фармацевтикалық өндірісте пайдаланылады. Соңғы кезде микробиальді эстеразаларға деген қызығушылық олардың пластик гидролизіне, нақты полиэтилентерефталат гидролизін жүргізуіне байланысты болды. *Bacillus paralicheniformis* T7 штаммы, $32 \pm 2,38$ Бір/мл эстераздық активтілігі бар фермент секрециясын жүргізетіні анықталды. Ақуызды масс-спектрометрия мен протеомды және геномикалық талдау нәтижесінде молекулалық массасы 26,8 кДа құрайтын бациллярлы эстераза айқындалды. Штаммның толық геном реттілігі негізінде олигонуклеотидтер таңдалды, олардың көмегімен эстераза гені амплификацияланып, pET-28c(+) векторының құрамында клондалды. *Escherichia coli* BL-21(DE3) жасушаларын құрамында эстераза гені бар вектор көмегімен трансформациялап, 614 мг/л шығымдылықпен рекомбинантты эстераза өндіретін штамм алынды. Рекомбинантты эстеразаны тазарту Ni-NTA сорбенте Ni^{2+} көмегімен жүргізілді. Зерттеулер рекомбинантты эстеразаның максималды активтілігі 40°C және pH 7,0 көрсеткішінде белгіледі. Фермент активтілігі температура диапазоны 30-55°C және pH 5,0-8,0 көрсеткіштерінде байқалады. Термотұрақтылықты зерттеу эстеразаның 30-50°C және pH 8,0-10,0 көрсеткіштеріндегі 15 минуттық инкубацияға шыдамдылығын көрсетті. *B. paralicheniformis* T7 штаммының терең ферментациясы және одан кейінгі культуралдық сұйықтықты кептіру арқылы эстеразалық белсенділігі $15328,1 \pm 528,6$ Бір/г препарат алынды. Алынған нәтижелер *B. paralicheniformis* T7 штаммы эстераза продуценті ретінде қолданылу мүмкіншілігін, ал эстераза май қышқылының эфирлерін деградациялау технологияларында гидролитикалық фермент ретінде қолданылу мүмкіншілігін дәлелдейді.

Кілтгі сөздер: Эстеразалар, *Bacillus*, Фермент, Клондау, Штамм, Рекомбинантты.

КІРІСПЕ

Эстеразалар (EC 3.1.1.1) — май қышқылдарының жай эфирлерінің трансэтерификациясы мен гидролизін катализдейтін, гидролаза классына кіретін ферменттер [1]. Бұл ферменттер серингидролазалар тобына кіреді, структуралық құрамында α/β -гидролазды қатпары болады [2]. Олардың каталитикалық механизмі үш аминқышқылдар триадасына негізделген, олар активті центрде орналасқан серин, гистидин және аспартат немесе глутамат (Ser-His-Asp/Glu) [1]. Осылайша *Bacillus subtilis* E9 эстераза Ser77, His76 және Gly103 аминқышқылдық қалдықтары лигандпен байланысып, керекті активтілік көрсеткіштерін береді [3].

Липазаларға қарағанда, эстеразалар кинетикалық қасиеттері мен субстраттық спецификалығында айырмашылықтарды көрсетеді [4]. Эстеразалар қысқа тізбекті (10 көміртек атомынан кем) суда еритін май қышқылдарының гидролизін іске асырса, липазалар ұзын тізбекті қалдықты (10 көміртек атомынан көп) ерімейтін триглицеридтерге қатысты активтілік көрсетеді [5]. Эстеразалар табиғатта кеңінен таралған және өсімдіктерде, жануарларда және микроорганизмдерде кездеседі [6], олар липидтердің деградациясына, сигналды жолдардың регуляциясы мен детоксикациясына қатысып, зат алмасуда маңызды функцияларды атқарады. Жоғарғы активтілік, температураның және pH көрсеткіштерінің кең диапазонындағы тұрақтылығы, еріткіштер мен детергенттерге деген төзімділігіне байланысты микробиальді эстеразалар жоғары қолданбалы құндылыққа ие. Бұл ферменттер био-

отын дайындау, тағам шикізатын өңдеу, пестицидтерден тазарту, фармацевтикалық синтез, косметикалық өндіріс сынды салаларда өз қолданысын табады [7, 8].

Өндірістік мәнге ие эстераза өндіруші микроорганизмдерге *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* және *Bacillus* туыстарына жататын бактерияларды айта аламыз [9-11]. Бірақ өндірістік қолданыс үшін тиімді әрі тұрақты ферментті жүйе жасау мақсатында жетілдірілген каталитикалық сипаттамалары бар жаңа штаммдарды іздеу жалғастырылуда.

Жұмыстың мақсаты *B. paralicheniformis* T7 штаммы өндіретін эстеразаны зерттеу болып табылды. Мақсатқа сай келесі тапсырмалар қойылды: эстераза генін клондау және оның *E. coli* жасушаларындағы экспрессиясы, рекомбинантты ферментті бөлу және тазарту, бациллярлы эстеразаның биохимиялық сипаттамаларын зерттеу. Штамм-продуценттің практикалық маңыздылығына баға беру мақсатында *B. paralicheniformis* T7 штаммын терең ферментациялық жағдайда культивациялау жүргізіліп, кептірілген эстеразалық активтілігі бар препарат алынды.

МАТЕРИАЛДАР МЕН ӘДІСТЕР

Реагенттер, коректік орталар, ферменттер

Жұмыста Sigma (Сент-Луис, АҚШ) және AppliChem (Дармштадт, Германия) өндірушілерінің химиялық реагенттері қолданылды, коректік орталардың ингредиенттері Titan (Индия) және Sigma өндірушісіне тиесілі. *B. paralicheniformis* және *E. coli* штамдарының культивациясына Луриа-Бертани (ЛБ) бульоны (0,5 г/л ашытқы

экстракты, 1 г/л ферментативті триптон, 0,5 г/л NaCl pH 7.0) және оның агарландырылған түрі. Thermo Fisher Scientific (АҚШ) өндірген нуклеин алмасу ферменттері қолданылды.

Штаммдар, векторлар, олигонуклеотидтер

Жұмыста *B. paralicheniformis* T7, *E. coli* DH5 α (Promega, АҚШ), *E. coli* BL-21(DE3) (Novagen, АҚШ) штаммдары қолданылды. pET-28c(+) (Novagen) векторы эстераза генін клондау және *E. coli* жасушаішілік экспрессиясы үшін қолданылды. EsteraseFW (5'-GGGAATTCCATATGTGCGGAGAGGACGATCCC-3') және EsteraseRV (5'-CGCGGATCCTCAAGAA GTTTTTATAACTTTACTTTCAT-3') олигонуклеотидтері эстераза генін клондау үшін пайдаланылды. T7fw (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') және T7rv (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') олигонуклеотидтері енгізілген фрагментті секвенирлеу үшін қолданылды.

B. paralicheniformis штаммының секреторлық протеомасын масс-спектрометриялық зерттеу

B. paralicheniformis T7 штаммының жасушаларын 5мл ЛБ бульонында 16 сағат бойы, 37°C температурада, шайқау көрсеткіші 170 айн/мин жағдайында шейкерде культивацияланды. Культураны 150мл эксперименталды қауырсынды қоректік ортаға (0,3 г/л NaH₂PO₄, 0,35 г/л Na₂HPO₄ және 7,5 г/л қауырсын, 2 г/л ашытқы экстрактісі, pH 7,0) инокуляциялады. Культивациялау 48 сағат бойына, ұқсас жағдайда жүргізді. Тұнба үстіндегі сұйықтықты 10 минут бойы 10 000 × g, 4°C көрсеткіштерінде жинақталды, тесікше өлшемі 0,22 мкм құрайтын мембрана арқылы сүзгілеп, 10K MWCO PierceTM (Thermo Scientific) ақуыз концентраторында 150 есе шоғырландырылды. Ақуыздарды бөлу 12% ПААГ-НДС (денатурация жағдайындағы полиакриламидтегі гелэлектрофорез) гелінің көмегімен іске асты. Ақуыздардың пептидік фрагментациясы үшін ақуыздарды гелден бөліп алып трипсинмен (Promega, АҚШ) өңдеді. Пептидтерді Acclaim Pep-Map RSLC (Thermo Scientific) колонкасы арқылы ацетонитрил градиентінде ажыратылды. Иондарды енгізудің модификацияланбаған CaptiveSpray көзі Maxis Impact II (Bruker, Германия) құрылғысымен ЖТСХ жүйесін біріктіру үшін қолданылды. MS сканерлеудің масса диапазоны иондардың оң полярлық редимінде 150-2200 m/z аралығында орнатылды. *B. Paralicheniformis* T7 штаммының аннотацияланған геномы (GenBank CP124861 қолжетімділік нөмірі) осы штаммдағы барлық ақуыздардың дерекқор базасын жасау үшін қолданылды.

Эстераза генін клондау және гендік-инженериялық конструкцияны құрау

B. paralicheniformis T7 штаммын 5мл қоректік бульонында 18 сағат бойы, 37°C 150 айн/мин көрсеткішінде шейкер-инкубаторда культивацияланды. Жасушаларды 7 минут, 4°C 6000 × g көрсеткіштерінде центрифугалау арқылы жинақтап, геномдық ДНҚ Monarch Nucleic Acid Purification Kit (Promega) жинағы арқылы бөлініп алынды. *B. paralicheniformis* T7 геномдық ДНҚ құрамынан эстераза гені ПТР әдісі арқылы, EsteraseFW/EsteraseRV олигонуклеотидтерін қолданумен амплификацияланды. ПТР қоспасының 50 мкл көлемінің құрамында 10 мкл 5X Phusion Buffer, 5 мкл dNTPs, әр олигонуклеотидтің 10мкМ

концентрациясынан 1 мкл, 1 мкл геномдық ДНҚ (100 мкг/мл), 2 мкл Phusion ДНҚ полимеразасы (5 Бір/мкл) және 30 мкл нуклеазасыз су. ПТР бағдарламасы келесідей: бастапқы денатурация 98°C – 5 минут; 30 цикл (98°C – 1 минут, 55°C – 1 минут, 72°C – 1 минут); инкубация 72°C – 10 минут. Амплификацияланған фрагмент pET-28c(+) векторының құрамына NdeI және BamHI сайттары арқылы, сәйкесінше 2x Tango буфердағы рестрикциялық эндонуклеазаларды қолдану арқылы клондалды. Нәтижелік конструкцияның T7 аймағы Сенгер [12] әдісі арқылы, BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fischer Scientific) қолданылумен секвенирленді. ДНҚ фрагменттерін бөлу ABI 3730xl (Applied Biosystem, АҚШ) автоматтандырылған секвенаторында жүргізді. *E. coli* DH5 α жасушаларында плазмидті векторды өндіріп, GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, АҚШ) жинағымен бөлініп алынды.

Эстераза генінің экспрессиясы және рекомбинантты фермент алу

E. coli BL-21(DE3) компетентті жасушалары эстераза гені бар плазмидті вектормен трансформацияланды. Трансформацияны электропорация әдісімен MicroPulser (Bio-Rad, АҚШ) электропораторында келесідей режимде өткізілді: кювета 2,0 мм; кернеу 2,5 кВ; өткізу уақыты 4,7 мс. Трансформант клондар канамицин қосылған ЛБ-агарда (50 мкг/мл) іріктеліп, канамицин қосылған ЛБ-бульонында OD₆₀₀ = 0,6 жеткенше дейін культивацияланды, содан кейін 0,5 мМ концентрациядағы изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) қосылып 18°C 16 сағат бойы ақуыз индукциясы жүргізілді.

Жасушаларды 6 минут 6000×g режимінде центрифугалау арқылы жиналып, Sonicators (Qsonica, АҚШ) соникаторында ультрадыбыспен лизистен өтті. Суда еритін фракциясын 4°C, 40 000×g 1 сағат центрифугалау арқылы бөліп алып, алдын ала 20 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 500 мМ NaCl, 20 мМ Имидазол буферімен теңестірілген Ni-NTA (Invitrogen, Германия) колонкасына енгізілді. Рекомбинантты ақуызды имидазол бойынша сатылы градиент бойынша элюирленді: 20 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 500 мМ NaCl буферінде 100 мМ, 150 мМ, 200 мМ и 250 мМ. Фракциялар ПААГ-НДС гелінде электрофорез әдісі арқылы талдалынды. Оң фракциялар шекті мәні 10 000 ақуыз концентраторы (Pierce™ Protein Concentrators PES, Thermo Scientific) арқылы концентрацияланып, ортаның буфері ауыстырылды, ақуыз концентрациясы өлшеніп, келесі зерттеулерде қолданылды.

ПААГ-НДС электрофорезі

Ақуыздардың электрофоретикалық бөлінуін натрий додецилсульфатымен полиакриламидті гелдегі электрофорезді 12% полиакриламидті гелде MiniProtean-IV (Bio-Rad Laboratories Inc) камерасында Лэмбли[13] әдісі арқылы өткізілді. Электрофорезді өткізу жағдайлары келесідей: 120В, 90 минут бойы. Гель R250 бриллиант көк 2% Кумасси 50% этанол және 10% сірке қышқылында боялып, 25% этанолда және 7,5% сірке қышқылында жуылды. Unstained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs #P7717) ақуыз молекулалық массасын анықтайтын маркер қолданылды.

Эстеразды активтілікті анықтау

Эстераздық активтілікті нұсқаулық [14] бойынша

анықталды. 350 мкл 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 буферіне 100мкл сынама және 50 мкл субстрат (изопропанолда ерітілген 10 mM p-нитрофенил октаноат немесе p-нитрофенил ацетат) қосылды. 40°C, 10 минут бойы инкубациялап, реакцияны 1 мл этанолмен тоқтатылды. Ерітінді 3 минут бойы 1000×g көрсеткішінде центрифугаланып, UV190i (Shimadzu, Жапония) спектрофотометрінде 405nm толқын ұзындығында сіңіру режимінде өлшенді. Эстераздық активтіліктің бірлігі осы жағдайда 1 минут ішінде 1 мкмоль p-нитрофенил түзілуіне тең болды.

Акуыз концентрациясын анықтау

Акуыз концентрациясын Бредфорд [15] әдісімен, Protein Assay Dye (Bio-Rad) реактивін қолдану арқылы, стандарт ретінде бұқа сарысуының альбуминін қолдану арқылы өткізілді. Бұл үшін 100 мкл Бредфорд реактивін 860 мкл 10% PBS және 1% глицеринді буферге 40 мкл сынама қосылды. Ерітіндіні шайқап, 2 минут бойын бөлме температурасында инкубациялады. Оптикалық тығыздықты толқын ұзындығы 595 nm көрсеткішінде спектрофотометрде өлшелінді.

Температура мен pH көрсеткіштерінің рекомбинантты эстеразаның ферментативті активтілігіне және тұрақтылығына әсері

Ферментативті активтілік pH көрсеткіштері 3,0 және 11,0 аралық диапазонында өлшенді. Келесідей буфер жүйелері қолданылды: цитратты буфер (pH 3,0–6,0), натрий-фосфатты буфер (pH 6,0–7,5), Tris-HCl буфері (pH 7,5–9,0) және глицин-NaOH буфері (pH 9,0–11,0). Алынған есептік көрсеткіштер максималды көрсеткішті 100% ретінде алынғандағы салыстырмалы бірліктерге ауыстырылды. pH тұрақтылығын тексеруге арналған зерттеулерге фермент алдын-ала 2 сағат 10 mM цитратты буферде (pH 4,0 және 6,0), 50 mM Tris-HCl буферінде (pH 8,0) және 50 mM Tris-HCl (pH 10,0) буферінде инкубацияланып, қалдықты активтілік 50 mM Tris-HCl буферінде (pH 7,0) есептелінді. Нәтижелерді инкубацияланбаған экстрактың активтілігін 100% көрсеткіш ретінде алынғандағы салыстырмалы түрде пайыздық есеппен алынды. Эстераздық активтілікке температураның әсерін 30–80°C (5°C интервалмен) температура диапазонында зерттелінді. Максималды ферментативті активтілік 100% көрсеткіш ретінде қабылданды. Ферменттің термотұрақтылығын анықтауға алдын-ала 5 сағат 50 mM Tris-HCl буферінде (pH 7,0) 40°C, 50°C, 60°C немесе 70°C температура көрсеткіштерінде инкубацияланып, қалдықты активтілік 50 mM Tris-HCl буферінде (pH 7,0) 40°C көрсеткішінде өлшенді. Нәтижелерді инкубацияланбаған экстрактың активтілігін 100% көрсеткіш ретінде алынғандағы салыстырмалы түрде пайыздық есеппен алынды.

B. paralicheniformis T7 штаммының терең ферментациясы және эстеразды активтілігі бар препарат алу

B. paralicheniformis T7 штаммын 10-литрлік Biostat (Sartorius, Германия) биореакторында терең ферментация әдісімен өсірілді. Культура 6 литр стерильді қауырсынды қоректік ортаға инокуляцияланды. Ферментация шарттары: температура-37°C, араластыру - 450 айн/мин, аэрация - 6 л/мин, культивация мерзімі - 48 сағат. Культураны тұндыру 11000×g жағдайында центрифугалау және 0,22 мкм сүзгі арқылы жүргізілді. Культуралдық сұйықтықты OM-1500A (Shang Hai Ou Meng, Қытай) бүркіп

кептіргішінде кептірілді: камераға кірердегі температура 55°C, камерадан шығардағы температура 40°C, шашырату импульсінің ұзақтығы 1 секунд және сынаманы жеткізу жылдамдығы 4,5 мл/мин. Алынған құрғақ ұнтақтың ферментативтік активтілігі есептелді.

Биоинформатикалық бағдарламалар және статистикалық талдау

Капиллярлы секвенирлеуден кейінгі хроматограмманы талдау үшін Vector NTI Advance 11 (Thermo Fisher Scientific) бағдарламасы қолданылды. Акуыз ретілігінің құрамында секреторлы пептидің бар-жоғын анықтау он-лайн қолжетімді SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) платформасында жүргізілді. *B. paralicheniformis* T7 штаммының секреторлы акуыздарының акуыз масс-спектрі және протеомды талдау Mascot (<https://www.matrixscience.com>) платформасында өткізілді. Барлық активтілік анықтау зерттеулері үш қайталанымда зерттелді. Ферментативті активтілікті анықтау мәліметтері тәуелсіз активтілік анализдеріне сүйенді, алайда, орта мән, стандартты ауытқу (SD) және p-мәндер GraphPad Prism 8.0.1 нұсқасын (GraphPad Software, АҚШ) қолдану арқылы есептелді. Барлық ақпараттар орта мән ± SD (n = 3) ретінде алынды.

НӘТИЖЕЛЕР МЕН ТАЛҚЫЛАУ

B. paralicheniformis T7 штаммының секреторлы протеомасындағы эстераза идентификациясы

B. paralicheniformis T7 штаммын қауырсынды қоректік ортада культивациялау нәтижесінде эстераздық активтілігі бар секреторлы экстракт алынды. Осы экстрактты концентрлеуден өткізіп, секреторлы протеомасын акуызды масс-спектрометрия әдісі арқылы Mascot платформасында протеомды зерттеу арқылы 26,8 кДа молекулярлық массалы эстераза идентификацияланды. Протеомды анализ және *B. paralicheniformis* T7 штаммының геномын салыстыру нәтижесінде геномдық ДНҚ бойында эстераза генінің локализациясы анықталды: 3605925-3606563. Эстеразаның аминқышқылдық реттілігі 212 аминқышқыл қалдығынан тұратынын көрсетті: MTLQY TALGDSLTVGVGAGLFEPGFVQRYKRKMEEDLNECVS LLVFAKSGLETSDILAMLNPFIMEQVKKADVITITGCG NDLLQSLEIYEKEKDEHVFLEASSHCQKNYSGLMEKIG DIKGDKDTRYLVRLNLNYPFISIELADKWISGFNRHL KQLESAPQIKVIDTYAVFKGHEQEYLSIDRVHPNSRGY EAMAENLRAAGYGPLKS. SignalP 5.0 бағдарламасының көмегімен талдау нәтижесінде бастапқы 11 аминқышқыл (MVLIFLLLLAG) жасушадан тыс эстераза секрециясын кодтайтын пептид екені анықталды.

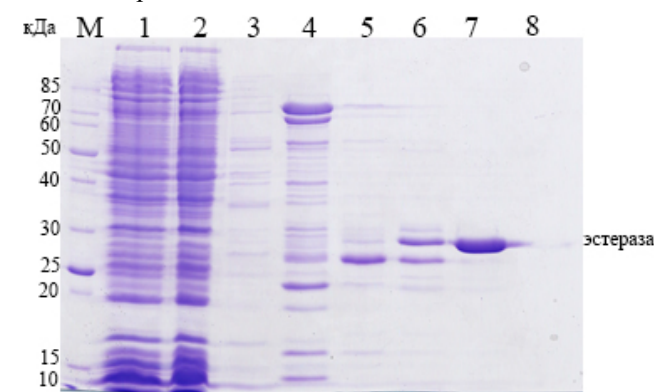
Эстеразаны клондау

Геномдағы эстеразаның реттілігі мен локализациясы жайлы мәліметтің негізінде олигонуклеотидтер таңдалып алынды, ол реттілік эстераза генін секреторлы пептидсіз түрін амплификациялауға негізделген. *B. paralicheniformis* T7 штаммының геномдық ДНҚ-сынан ұзындығы 678 н.ж, секреторлы пептидсіз эстераза гені амплификацияланып, T7 индуцибельді бактериофаг промоторының бақылау астындағы NdeI және BamHI сайттары бойынша pET-28c(+) векторында клондалды. Нәтижелік

ақуыз N-ұшынан ашық оқылу рамкасында гексагистидинді таңбасы болады және 247 аминқышқылдан құралады. Есептік молекулалық массасы 27,9 кДа, рекомбинантты ақуыздың болжамды рІ көрсеткіші 9,56 көрсетті.

Эстераза генінің экспрессиясы және рекомбинантты ақуызды хроматографиялық тазарту

E. coli BL-21(DE3) жасушаларындағы эстераза генінің экспрессиясы ақуыздың суда еритін фракциясында және тұнбада рекомбинантты эстераза инклюзиялық денешік ретінде жинақталатынын көрсетті. Рекомбинантты эстераза құрамында 6His-tag болуы жоғары деңгейде тазартылған ақуызды алудың металлоаффинді хроматография әдісі ең тиімді екенін айқындады. Хроматографиялық тазарту кезінде рекомбинантты ақуыз Ni-NTA колонкасынан имидазол концентрациясы 250 мМ жеткенде элюирленді (сурет 1). Тазартылған ферменттің концентрациясы 0,6 мг/мл, ал рекомбинантты эстераза шығымы 1 литрден 614 мг екені көрсетілді.

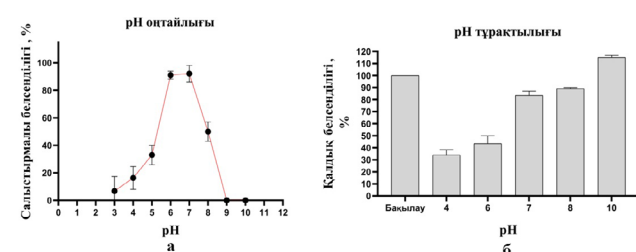


1-фракция Ni-NTA дейін, 2-фракция Ni-NTA кейін, 3-8 имидазолды элюаттар, 3-20 мМ, 4-80 мМ, 5-100 мМ, 6-150 мМ, 7-250 мМ, 8-500 мМ, M-ақуыздық маркер

Сурет 1. ПААГ-НДС рекомбинантты эстеразаның Ni-NTA хроматографиялық тазартудан кейінгі электрофорезі

Рекомбинантты эстеразаның биохимиялық сипаттамалары

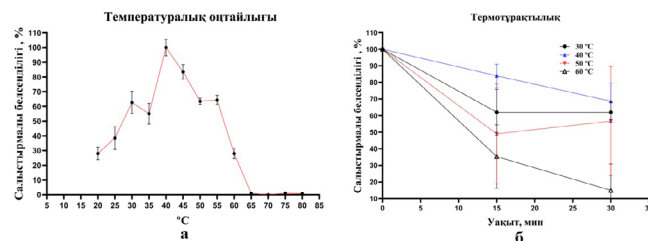
Рекомбинантты эстеразаның ферментативтік активтілігінің рН мәндеріне тәуелділігі р-нитрофенил ацетат субстратында рН 3,0–10,0 мәндерінің диапазонында зерттелді. Нәтижелер көрсеткендей, рекомбинантты эстераза рН мәндерінің 5,0-ден 8,0-ге дейінгі аралығында активті (сурет 2а) және максималды активтілігін 50 мМ Tris-HCl, рН 7,0 буферінде көрсететіні белгіленді. Рекомбинантты эстеразаның рН тұрақтылығын зерттеу ферменттің қалдықты активтілігі 2 сағат инкубациядан кейін рН 4,0 бу-



Сурет 2. Ферментативтік активтілікке рН көрсеткішінің әсері (а) және рекомбинантты эстеразаның тұрақтылығы (б)

ферінде $45\% \pm 19,558$, рН 6,0 буферінде $26\% \pm 24,173$, рН 8,0 буферінде $89\% \pm 1$ және рН 10,0 буферінде $110\% \pm 2$ екені көрсетілді (сурет 2б).

Рекомбинантты эстеразаның активтілігінің температура көрсеткіштеріне тәуелділігін 25–80°C аралығында зерттеу ферменттің ең көп активтілігі 40°C-та байқалатынын көрсетті (сурет 3а).



Сурет 3. Ферментативтік активтілікке температура көрсеткішінің әсері (а) және рекомбинантты эстеразаның тұрақтылығы (б)

Рекомбинантты фермент 72% активтілігін 30–55°C аралығында сақтайды. 60°C мәнінде эстеразалық активтілік максималды көрсеткіштің 28% сақтайды. 65°C және одан жоғары температуралық көрсеткіштегі активтілікті анықтау ферменттің эстеразалық активтілікті жоғалтатынын көрсетті. 3б суретінде көрсетілгендей 30 минут 30°C, 40°C, 50° және 60°C мәндерінде инкубация нәтижесінде қалдықты белсенділік белгіленді. Алынған мәліметтерге сүйене отырып, фермент 70% активтілігін 50°C мәнінде барлық инкубация уақытында сақтайтынын; 60°C мәнінде инкубациядан кейін қалдықты активтілік 83% құрайтындығы дәлелденді. 70°C мәнінде 15 минуттық инкубациядан кейінге қалдықты активтілік 16,5%, 30 минуттан кейін 0,5% төмен активтілік құрады.

B. paralicheniformis T7 штаммының терең ферментациясы және эстеразды активтілігі бар препарат алу

10 литрлік биореакторда 48 сағат бойы терең ферментация әдісімен культивациялау штаммның қауырсын және ашытқы экстрактісі азот пен көміртектің жалғыз көзі ретінде белгіленген қоректік ортада тұрақты өсуін көрсетті. Колония түзуші бірлікті есептеу, 18 сағаттық ферментация нәтижесінде культура тығыздығы $0,3 \times 10^9$ КҚБ/мл, 24 сағаттан кейін 1×10^9 КҚБ/мл және 48 сағаттан кейін $5,3 \times 10^9$ КҚБ/мл екенін, ал ферментацияның соңғы кезеңіндегі р-нитрофенилге қатысты активтілігі $18,3 \pm 2,4$ Бір/мл құрады. Кептіруден кейінгі құрғақ препараттың активтілігі $15328,1 \pm 528,6$ Бір/г құрады.

Қоршаған ортадан бөлініп алынған микроорганизмдер әртүрлі қолданбалы мәні бар ферменттердің көзі ретінде белгілі [16]. Ерекше мәнге ие *Bacillus* туысына жататын микроорганизмдер өзінің ақуыз синтезінің жоғарғы көрсеткіші, ферменттер секрециясына қабілеті және өндірістік қолданысқа жарамдылығымен мәлім [17]. Микробты шығу тегіне ие ферменттердің арасында эстеразалар әртүрлі салада сұранысқа ие, соның ішінде: биодизель өндірісінде, тағам өнімдерінің терең өңделуі, химиялық пестицидтерді көкөніс пен жеміс құрамынан жою, косметикалық өндірісте, химиялық синтез және дәрілік өнімдерді шығару [7, 8, 18]. Осы зерттеуде биохимиялық сипаттамалары зерттелген рекомбинантты эстераза алынды. Атап айтқанда, *B. paralicheniformis* T7

Кесте 1. Бациллярлы эстеразалардың қатарының активтілігі максималды көрсеткішіне жетуі үшін рН және температура мәндері.

Штамм	рН оптимум	Температуралық оптимум, °С	Дерек көзі
<i>Bacillus paralicheniformis</i> T7	7,0	40	Осы зерттеу
<i>Bacillus</i> sp. JR3	7,0	30	[19]
<i>Bacillus licheniformis</i>	8,0	30	[20]
<i>Bacillus subtilis</i> WB600	6.5	65	[21]
<i>Bacillus megaterium</i> WZ009	11,5	25	[22]
<i>Bacillus subtilis</i> E9	7,0	40	[23]
<i>Bacillus</i> sp. K91	4,5	45	[24]
<i>Bacillus cereus</i> WZZ001	7,0	40	[25]
<i>Bacillus</i> sp. K91	9,0	50	[26]
<i>Bacillus subtilis</i> DSM402 (BS2)	7.5	40	[27]

эстеразасы рН 7,0 және температураның 40°C мәнінде максималды активтілікке ие екендігі көрсетілді. Кестеде (кесте 1) келтірілгендей басқа бациллярлы көздерден алынған эстеразалардың биохимиялық параметрлері салыстырылды.

Кесте 1 белгіленгендей, *B. paralicheniformis* T7 эстеразасы секілді бациллярлы эстеразалардың басым бөлігі бейтарап немесе сілтілі фермент болып есептеледі, *Bacillus* sp. K91 [24] эстеразасын қоспағанда, себебі ол қышқыл эстераза болып табылады. *Bacillus* туысына жататын эстеразалардың максималды активтілікке ие температуралық диапазоны 25°C *B. megaterium* WZ009 [22] үшін және *B. subtilis* WB600 [21] 65°C көрсеткішіне дейінгі аралықты қамтиды. Бациллярлы эстеразалардың температуралық көрсеткіштерін басқа туысқа жататын түрлер эстеразаларымен салыстыру айқын айырмашылықты көрсетпеді, осылайша *Alteromonas* sp. 39-G1 [1] эстеразасының температуралық оптимумы 45°C мәнінде белгіленсе, ал *Geobacillus* sp. JM6 [28] эстеразасының максималды активтілігі 60°C мәнінде белгіленген. Бациллярлы эстеразаларға субстрат ретінде *Bacillus* sp. K91 [21], *B. subtilis* DSM402 [27] ферменттеріне байланысты р-нитрофенол бутират (C4) және *B. paralicheniformis* T7 эстеразасына байланысты р-нитрофенил ацетат (C2) және р-нитрофенил октаноат (C8) бола алады. Бациллярлы эстеразалардың молекулалық массасы *Bacillus* sp. K91 [26] үшін 24,5 кДа және *B. licheniformis* [20] 25,0 кДа көрсеткішінен *Bacillus* sp. K91 [24] 53,8 кДа және *B. megaterium* WZ009 [22] үшін 55,0 кДа көрсеткіштеріне дейінгі аралықты қамтиды. *B. paralicheniformis* T7 эстеразасы молекулалық масса көрсеткіші бойынша аталған молекулалық масса диапазон құрамына кіріп, басқа көптеген бациллярлы эстеразалар секілді мономерлі ақуыз болып табылады. Ақуыз концентрациясының көрсеткіштерін ескере отырып жасалған есептер *B. paralicheniformis* T7 тазартылған рекомбинантты эстеразаның меншікті активтілігі $216,3 \pm 55,3$ Бір/мг екенін белгіледі. *B. paralicheniformis* T7 штаммының биореакторда қауырсынды, 2 % ашытқы экстрактісі қосылған минимальді коректік ортада 48 сағат бойы ферментациясы экстрацеллюлярлы секреция деңгейі $18,3 \pm 2,4$ Бір/мл көрсеткішіне қол жеткізу мүмкіншілігін берді, бұл көрсеткіш аналогиялық *B. subtilis* штаммы көрсеткен E9 – 10 Бір/мл [23] деңгейінен 1,8 есе

көп екенін дәлелдеді. 55°C-60°C аралығындағы жоғарғы термотұрақтылық ферментті ыстық ауа ағынында активтіліктің едәуір мәнін жоғалтпай әртүрлі индустриалды қолданымға жарамды ферментті препарат дайындауға мүмкіндіктер береді.

ҚОРЫТЫНДЫ

Ақуызды масс-спектрометрия мен протеомика және геномика әдістері арқылы *B. paralicheniformis* T7 штаммының клеткадан тыс протеомасынан молекулалық массасы 26,8 кДа құрайтын секреторлы эстераза идентификацияланды. Эстераза гені рЕТ-28с(+) векторының құрамында клондалып, плазмидті экспрессияның көмегімен *E. coli* жасушаларында рекомбинантты эстераза алынды. Рекомбинантты эстераза Ni^{2+} иондарында металоаффинді хроматография әдісімен жасушалық лизаттан бөлініп, тазартылды. Тазартылған фермент шығымы индустриалды рекомбинантты культураның 1 литрінен 614 мг құрады. Биохимиялық сипаттамаларын зерттеу рекомбинантты эстеразаның 30-55°C температуралық және рН 5,0-8,0 диапазонында активтілік көрсететінін, максимумы 40°C, рН 7,0 көрсеткіштерінде жететінін белгіледі. Фермент 30-50°C температура көрсеткіштерінде 30 минут инкубацияға және рН 8,0-10,0 мәндерінде 120 минут инкубацияға тұрақты. *B. paralicheniformis* T7 нативті штаммының қауырсынды коректік ортада инкубациясы $18,32 \pm 2,38$ Бір/мл активтілік көрсеткішіне ие эстераза өндіреді. Культуралды сұйықтықты кептіру активтілік көрсеткіші $15328,1 \pm 528,6$ Бір/г тең құрғақ препарат алуға мүмкіншілік берді. *B. paralicheniformis* T7 эстеразасы гидролиз және май қышқылдарының гидролизі технологияларында қолдану перспективасына ие.

ҚАРЖЫЛАНДЫРУ

Зерттеулер Қазақстан Республикасының ғылым және жоғарғы білім Министрлігінің ғылыми Комитетінің қаржыландыру аясында өткізілді (грант №AP19679339).

ҚЫЗЫҒУШЫЛЫҚТАРДЫҢ ҚАҚТЫҒЫСЫ

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

ҚОЛДАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1. Seok-Jae W., It, sup, gt, It, sup, gt, Han Byeol J., It, sup, gt, It, sup, gt, Hyung Kwoun K., It, sup, gt, It, sup, gt. Characterization of Novel Salt-Tolerant Esterase Isolated from the Marine Bacterium *Alteromonas*; sp. 39-G1 // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – V. 30, No 2. – P. 216-225.
2. Nardini M., Dijkstra B. W. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing // *Curr Opin Struct Biol*. – 1999. – V. 9, No 6. – P. 732-7.
3. 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. – V. 64, No 7. – P. 814-824.
4. Chahinian H., Sarda L. Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases // *Protein Pept Lett*. – 2009. – V. 16, No 10. – P. 1149-61.
5. Kumar A., Dhar K., Kanwar S. S., Arora P. K. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications // *Biological Procedures Online*. – 2016. – V. 18, No 1. – P. 2.
6. 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. – V. 58, No 2. – P. 131-143.
7. Ng A. M. J., Zhang H., Nguyen G. K. T. Zymography for Picogram Detection of Lipase and Esterase Activities // *Molecules*. – 2021. – V. 26, No 6. – P. 1542.
8. 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. – V. 86, No 4. – P. 1475-1487.
9. 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. – V. 65, No 5. – P. 748-755.
10. Noby N., Hussein A., Saeed H., Embaby A. M. "Recombinant cold -adapted halotolerant, organic solvent-stable esterase (estHIJ) from *Bacillus halodurans* // *Analytical Biochemistry*. – 2020. – V. 591. – P. 113554.
11. 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. – V. 98, No 4. – P. 1719-1726.
12. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1977. – V. 74, No 12. – P. 5463-7.
13. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – V. 227, No 5259. – P. 680-5.
14. 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. – V. 368. – P. 130868.
15. 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. – V. 72. – P. 248-54.
16. Katsimpouras C., Stephanopoulos G. Enzymes in biotechnology: Critical platform technologies for bioprocess development // *Curr Opin Biotechnol*. – 2021. – V. 69. – P. 91-102.
17. Chandra P., Enespa, Singh R., Arora P. K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review // *Microb Cell Fact*. – 2020. – V. 19, No 1. – P. 169.
18. Bornscheuer U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2002. – V. 26, No 1. – P. 73-81.
19. 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. – V. 12, No 7. – P. e0181029.
20. 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. – V. 111. – P. 1183-1193.
21. Liu P., Guo J., Miao L., Liu H. Enhancing the secretion of a feruloyl esterase in *Bacillus subtilis* by signal peptide screening and rational design // *Protein Expr Purif*. – 2022. – V. 200. – P. 106165.
22. Zheng J. Y., Wang J., Zhou S. S., Li X. J., Ying X. X., Wang Z. A stereoselective esterase from *Bacillus megaterium*: Purification, gene cloning, expression and catalytic properties // *Protein Expr Purif*. – 2017. – V. 136. – P. 66-72.
23. Soumya P., Kochupurackal J. Pineapple Peel Extract as an Effective Substrate for Esterase Production from *Bacillus subtilis* E9 // *Curr Microbiol*. – 2020. – V. 77, No 10. – P. 3024-3034.
24. Ding J., Wang C., Xie Z., Li J., Yang Y., Mu Y., Tang X., Xu B., Zhou J., Huang Z. Properties of a newly identified esterase from *Bacillus* sp. K91 and its novel function in diisobutyl phthalate degradation // *PLoS One*. – 2015. – V. 10, No 3. – P. e0119216.
25. Zheng J., Lan X., Huang L., Zhang Y., Wang Z. Kinetic resolution of N-acetyl-DL-alanine methyl ester using immobilized *Escherichia coli* cells bearing recombinant esterase from *Bacillus cereus* // *Chirality*. – 2018. – V. 30, No 7. – P. 907-912.
26. 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. – V. 24, No 11. – P. 1551-8.
27. 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. – V. 2, No 2. – P. 249-53.
28. Zhu Y., Zheng W., Ni H., Liu H., Xiao A., Cai H.

Molecular cloning and characterization of a new and highly thermostable esterase from *Geobacillus* sp. JM6 // *Journal of Basic Microbiology*. – 2015. – V. 55, No 10. – P. 1219-1231.

REFERENCES

1. Seok-Jae W., It, sup, gt, It, sup, gt, Han Byeol J., It, sup, gt, It, sup, gt, Hyung Kwoun K., It, sup, gt, It, sup, gt. Characterization of Novel Salt-Tolerant Esterase Isolated from the Marine Bacterium *Alteromonas* sp. 39-G1 // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – V. 30, No 2. – P. 216-225.
2. Nardini M., Dijkstra B. W. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing // *Curr Opin Struct Biol*. – 1999. – V. 9, No 6. – P. 732-7.
3. 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. – V. 64, No 7. – P. 814-824.
4. Chahinian H., Sarda L. Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases // *Protein Pept Lett*. – 2009. – V. 16, No 10. – P. 1149-61.
5. Kumar A., Dhar K., Kanwar S. S., Arora P. K. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications // *Biological Procedures Online*. – 2016. – V. 18, No 1. – P. 2.
6. 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. – V. 58, No 2. – P. 131-143.
7. Ng A. M. J., Zhang H., Nguyen G. K. T. Zymography for Picogram Detection of Lipase and Esterase Activities // *Molecules*. – 2021. – V. 26, No 6. – P. 1542.
8. 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. – V. 86, No 4. – P. 1475-1487.
9. 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. – V. 65, No 5. – P. 748-755.
10. Noby N., Hussein A., Saeed H., Embaby A. M. "Recombinant cold -adapted halotolerant, organic solvent-stable esterase (estHIJ) from *Bacillus halodurans* // *Analytical Biochemistry*. – 2020. – V. 591. – P. 113554.
11. 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. – V. 98, No 4. – P. 1719-1726.
12. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1977. – V. 74, No 12. – P. 5463-7.
13. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – V. 227, No 5259. – P. 680-5.
14. 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. – V. 368. – P. 130868.
15. 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. – V. 72. – P. 248-54.
16. Katsimpouras C., Stephanopoulos G. Enzymes in biotechnology: Critical platform technologies for bioprocess development // *Curr Opin Biotechnol*. – 2021. – V. 69. – P. 91-102.
17. Chandra P., Enespa, Singh R., Arora P. K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review // *Microb Cell Fact*. – 2020. – V. 19, No 1. – P. 169.
18. Bornscheuer U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2002. – V. 26, No 1. – P. 73-81.
19. 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. – V. 12, No 7. – P. e0181029.
20. 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. – V. 111. – P. 1183-1193.
21. Liu P., Guo J., Miao L., Liu H. Enhancing the secretion of a feruloyl esterase in *Bacillus subtilis* by signal peptide screening and rational design // *Protein Expr Purif*. – 2022. – V. 200. – P. 106165.
22. Zheng J. Y., Wang J., Zhou S. S., Li X. J., Ying X. X., Wang Z. A stereoselective esterase from *Bacillus megaterium*: Purification, gene cloning, expression and catalytic properties // *Protein Expr Purif*. – 2017. – V. 136. – P. 66-72.
23. Soumya P., Kochupurackal J. Pineapple Peel Extract as an Effective Substrate for Esterase Production from *Bacillus subtilis* E9 // *Curr Microbiol*. – 2020. – V. 77, No 10. – P. 3024-3034.
24. Ding J., Wang C., Xie Z., Li J., Yang Y., Mu Y., Tang X., Xu B., Zhou J., Huang Z. Properties of a newly identified esterase from *Bacillus* sp. K91 and its novel function in diisobutyl phthalate degradation // *PLoS One*. – 2015. – V. 10, No 3. – P. e0119216.
25. Zheng J., Lan X., Huang L., Zhang Y., Wang Z. Kinetic resolution of N-acetyl-DL-alanine methyl ester using immobilized *Escherichia coli* cells bearing recombinant esterase from *Bacillus cereus* // *Chirality*. – 2018. – V. 30, No 7. – P. 907-912.
26. Ding J., Yu T., Liang L., Xie Z., Yang Y., Zhou J., Xu B., Li J., Huang Z. Biochemical characterization of a GDSSL-motif esterase from *Bacillus* sp. K91 with a new putative catalytic mechanism // *J Microbiol Biotechnol*. – 2014. – V. 24, No 11. – P. 1551-8.
27. 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. – V. 2, No 2. – P. 249-53.

28. Zhu Y., Zheng W., Ni H., Liu H., Xiao A., Cai H. Molecular cloning and characterization of a new and highly thermostable esterase from *Geobacillus* sp. JM6 // *Journal of Basic Microbiology.* – 2015. – V. 55, No 10. – P. 1219-1231.

УДК 579.63

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭСТЕРАЗЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА

Мусахметов А.^{1,2}, Астраханов М.¹, Актаева С.^{1,2}, Силаев Д.¹, Хасенов Б.^{1,2*}¹ ТОО Национальный центр биотехнологии, Коргалжынское шоссе, 13/5, Казахстан, Астана, 010000.² ТОО «GenLab», ул. М.Габдуллина, 19/1, Казахстан, Астана, 010000.

*khassenov@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Эстеразы являются гидролитическими ферментами, катализирующие гидролиз и трансэтерификацию эфиров жирных кислот с короткой цепью. Эстеразы являются распространенными в природе ферментами, встречаются в растениях, животных и микроорганизмах. Микробные эстеразы используют в производстве биотоплива, изделий косметической, пищевой и фармацевтической промышленности. В последнее время интерес к микробным эстеразам возник в связи с их способностью к гидролизу пластика, в частности полиэтилентерефталата. Установлено, что штамм *Bacillus paralicheniformis* T7 секретирует фермент с эстеразной активностью $18,32 \pm 2,38$ Ед/мл. Белковой масс-спектрометрией в сочетании с протеомикой и геномикой была установлена бациллярная эстераза с молекулярной массой 26,8 кДа. На основании последовательности полного генома штамма были подобраны олигонуклеотиды, с помощью которых ген эстеразы был амплифицирован и клонирован в векторе pET-28c(+). Трансформацией клеток *Escherichia coli* BL-21(DE3) с помощью вектора, несущего ген эстеразы был получен штамм, продуцирующий рекомбинантную эстеразу с выходом 614 мг/л. Очистку рекомбинантной эстеразы проводили на Ni^{2+} с помощью Ni-NTA сорбента. Исследования показали, что рекомбинантная эстераза имеет максимум активности при 40°C и pH 7,0. Фермент активен в диапазоне температур 30–55°C и pH 5,0–8,0. Изучение термостабильности показало, что эстераза устойчива к 15 минутной инкубации при 30–50°C и pH 8,0–10,0. Путем глубоинной ферментации штамма *B. paralicheniformis* T7 с последующим высушиванием культуральной жидкости позволило получить препарат с эстеразной активностью $15328,1 \pm 528,6$ Ед/г. Полученные результаты свидетельствуют, что штамм *B. paralicheniformis* T7 способен выступить в качестве продуцента эстеразы, а сама эстераза имеет перспективу применения в технологиях деградации эфиров жирных кислот в качестве гидролитического фермента.

Ключевые слова: Эстеразы, *Bacillus*, Фермент, Клонирование, Штамм, Рекомбинантный.

UDC 579.63

CLONING OF THE BACTERIAL ESTERASE GENE AND DETERMINATION OF THE BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE RECOMBINANT ENZYME

Mussakhmetov A.^{1,2}, Astrakhanov M.¹, Aktayeva S.^{1,2}, Silayev D.¹, Khassenov B.^{1,2*}¹National Center for Biotechnology LLP, 13/5 Korgalzhyn Road, Astana, 010000²«GenLab» LLP, 19/1 M. Gabdullin Street, Astana 010000, Kazakhstan.

*khassenov@biocenter.kz

ABSTRACT

Esterases are hydrolytic enzymes that catalyze the hydrolysis and transesterification of short-chain fatty acid esters. They are widespread in nature and can be found in plants, animals, and microorganisms. Microbial esterases are used in the production of biofuels, and in cosmetic, food, and pharmaceutical industries. Recently, microbial esterases have attracted interest due to their ability to hydrolyze plastics, particularly polyethylene terephthalate (PET). It was established that *Bacillus paralicheniformis* T7 secretes an enzyme with esterase activity of 18.32 ± 2.38 U/mL. Protein mass spectrometry in combination with proteomic and genomic analysis identified a bacillary esterase with a molecular weight of 26.8 kDa. Based on the complete genome sequence of the strain, oligonucleotides were designed to amplify the esterase gene, which was subsequently cloned into the pET-28c(+) vector. Transformation of *Escherichia coli* BL-21(DE3) cells with the esterase-containing vector resulted in a strain that produced recombinant esterase with a yield of 614 mg/L. The recombinant esterase was purified using Ni-NTA affinity chromatography on a Ni^{2+} column. Studies revealed that the recombinant esterase exhibits maximum activity at 40 °C and pH 7.0. The enzyme remains active within the temperature range of 30–55 °C and pH 5.0–8.0. Thermostability assays demonstrated that the esterase is stable after 15 minutes of incubation at 30–50 °C and within the pH range of 8.0–10.0. Submerged fermentation of *B. paralicheniformis* T7 followed by drying of the culture supernatant yielded a preparation with esterase activity of $15,328.1 \pm 528.6$ U/g. The results indicate that *B. paralicheniformis* T7 is a promising esterase-producing strain, and the enzyme itself holds potential for use as a hydrolytic biocatalyst in the degradation of fatty acid esters.

Keywords: Esterases; *Bacillus*; Enzyme; Cloning; Strain; Recombinant