

## БИОЛОГИЯ

УДК 602.7:606:577.15+602.3:579.852.11:577.151

А. В. КАЧАН, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ

ВАРИАНТЫ  $\alpha$ -АМИЛАЗЫ ШТАММА *BACILLUS SP. 406*  
С ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРНОЙ СТАБИЛЬНОСТЬЮ

(Представлено академиком И. Д. Волотовским)

Белорусский государственный университет, Минск

Поступило 26.01.2012

**Введение.** На сегодняшний день термостабильные ферменты используют во многих биотехнологических процессах [1]. Высокая термостабильность фермента позволяет уменьшить его расход в процессе реакции, так как повышение температуры реакции способствует увеличению количества и скорости выхода продукта.

$\alpha$ -Амилазы (ЕС 3.2.1.1) используются в ряде процессов промышленной переработки крахмалосодержащего сырья. Многие из этих процессов протекают при высоких температурах, что требует использования в таких процессах термостабильных  $\alpha$ -амилаз.

С применением методов рациональной инженерии в ряде лабораторий мира для некоторых  $\alpha$ -амилаз были выявлены аминокислотные замены, повышающие их температурную стабильность. Наиболее значительные успехи в этой области были достигнуты в работе по улучшению термостабильности  $\alpha$ -амилазы *Bacillus licheniformis* (BLA) [2], в которой описано влияние семи мутаций, стабилизирующих структуру BLA, причем суммарный эффект данных замен повышал температуру полуинактивации фермента более чем на 20 °С. Другим примером успешного применения методов рациональной инженерии стабильности ферментов является обнаружение в домене В  $\alpha$ -амилазы *B. amyloliquefaciens* (BAA) петли, снижающей температурную устойчивость фермента [3]. Удаление остатков Arg176-Gly177, формирующих выступающую структуру на поверхности молекулы  $\alpha$ -амилазы, приводило к увеличению стабильности. Такая же манипуляция была успешной и при повышении стабильности  $\alpha$ -амилаз *Bacillus sp. KSM-K38* [4], *Geobacillus stearothermophilus* [5], *Cytophaga sp.* [6].

В рамках настоящей работы были получены мутантные варианты гена  $\alpha$ -амилазы штамма *Bacillus sp. 406* (AB406) и изучено влияние аминокислотных замен Asn191Phe и Gly210Val и делеции 177Arg-178Gly (dRG) на термостабильность и некоторые другие свойства фермента. Также нами были получены и охарактеризованы мутантные варианты AB406, объединяющие выше-названные мутации в одном гене.

**Материалы и методы исследования.** Бактерии *E. coli* XL1-Blue ( $F^-::Tn10(Tet^r)$ ,  $proA^+B^+$ ,  $lacI^q$ ,  $\Delta(lacZ) M15 / recA1$ ,  $endA1$ ,  $gyrA96(Nal^r)$ ,  $thi-1$ ,  $hsdR17 (r_k^- m_k^-)$ ,  $glnV44$ ,  $relA1$ ,  $lac$ ) из коллекции штаммов микроорганизмов кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ использовали для клонирования рекомбинантных плазмид на основе pUC18, несущих варианты гена AB406. Плазмидная ДНК pUC18amy6-28, несущая нативный вариант этого гена, получена нами ранее [7]. Бактерии *E. coli* ES1301mutS и JM109, а также плазмидная ДНК pALTER-1 получены в составе набора Altered Sites® II in vitro Mutagenesis System (Promega). Бактерии культивировали на среде Лурия–Бертани (LB), содержащей 1,5 % агар-агара.

Выделение плазмидной ДНК, агарозный гель-электрофорез, рестрикционный анализ, трансформацию и электропорацию проводили по стандартным методикам, описанным в руководстве Маниатиса [8].

Моделирование третичной структуры амилазы штамма *Bacillus* sp. 406 проводили с помощью программы Swiss-Model (<http://www.expasy.org/swissmod/>) [9]. Для сравнительного анализа полученной модели в программе Deep View Swiss-PDB Viewer (доступна на <http://www.expasy.org/spdbv>) использовали структуры BLA (код в PDB: 1BLI) и BAA (код в PDB: 3BH4).

Плазмиду pALTER-1 выделяли используя GeneJET™ Plasmid Mini-prep Kit (Fermentas). Сайт-специфический мутагенез проводили с использованием Altered Sites® II in vitro Mutagenesis System (Promega) по предложенному производителем протоколу. В реакции мутагенеза для введения в ген мутаций использовались фосфорилированные олигонуклеотиды 5'-CCGCATTTTAAATTCACAGGAAAAGCGTGGGACTG-3' (для делеции dRG), 5'-CCGATGTTGTGAACGAAATG-3' (для замены G210V) и 5'-GTATCAAGTGAATTCGGCAACTA TGA-3' (для замены N191F). Наличие мутаций в гене амилазы подтверждали с помощью секвенирования рекомбинантной плазмидной ДНК.

Секвенирование ДНК проводилось по методу Сэнгера с использованием набора реактивов Cycle Reader™ Auto DNA Sequencing Kit (Fermentas). Для амплификации использовались меченый Cy5-праймер 5'-CTTTCCAGGTCGCGGGACTAC-3'. Разделение и детекция амплифицированных фрагментов проводились с помощью системы ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech) по стандартной методике с соответствующим программным обеспечением.

Частично очищенный препарат рекомбинантного фермента получали фракционированием клеток 16-часовой культуры *E. coli* XL1-Blue в среде LB, содержащей 1 % растворимого крахмала, выращенной при 37 °С с аэрацией. Фракционирование проводили методом осмотического шока [10] с последующим добавлением к полученной периплазматической фракции равного объема 0,1 М Na-фосфатного буфера (рН 7,0).

Измерение амилолитической активности проводили методом с использованием реактива с 3,5-динитросалициловой кислотой (ДНС) [11] с небольшими модификациями. В субстратную смесь объемом 0,45 мл, включавшую 1,1 % растворимого крахмала и 0,22 мМ CaCl<sub>2</sub> в 50 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7,0) добавляли 50 мкл аликвоты фермента, содержавшей 0,5–1,1 единиц активности, и инкубировали 15 мин при 50 °С. Реакцию останавливали добавлением 1,5 мл реактива с ДНС, после чего пробирки помещали в кипящую воду на 12 мин. После охлаждения интенсивность светопоглощения измеряли при 540 нм. За 1 единицу активности амилазы (1 U) принимали количество фермента, которое приводило к образованию 1 мкмоль редуцирующих сахаров (в эквиваленте глюкозы) за 1 минуту реакции в 1 мл реакционной смеси в условиях проведения эксперимента. Все эксперименты проводили по крайней мере в трех повторностях.

Оптимальный рН определяли, измеряя активность фермента в реакционных смесях с различными рН, для чего использовали следующие буферы (50 мМ): Na-ацетатный (рН 4,0 и 5,0), Na-фосфатный (рН 6,0 и 7,0), трис-HCl (рН 8,0), NaOH-глициновый (рН 9,0–10,0).

Профиль термостабильности фермента определяли инкубацией смеси, содержащей 0,5–1,1 ед. активности амилазы и 0,22 мМ CaCl<sub>2</sub> в 50 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7,0) при различных температурах (50–80 °С) в течение 20 мин, затем охлаждали на водяной бане в течение 15 мин и измеряли остаточную амилолитическую активность. Значение температуры полуинактивации ( $T_m$ ), равное температуре, при которой теряется половина активности препарата, определяли по графику профиля термостабильности.

Эффект температуры на кинетические параметры инактивации фермента определяли инкубацией смеси, содержащей 0,5–1,1 ед. активности амилазы и 0,22 мМ CaCl<sub>2</sub> в 50 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7,0) при 50–80 °С. Пробы отбирали каждые 10 мин и помещали на ледяную баню на 15 мин, после чего измеряли остаточную амилолитическую активность.

Константу скорости температурной инактивации ( $k_D$ ) рассчитывали при помощи графиков зависимости натурального логарифма остаточной амилолитической активности от времени термоинактивации. Для всех линейных зависимостей были получены 95 %-ные пороги значимости. Время полужизни ( $t_{1/2}$ ) при данной температуре находили из  $k_D$ . Энергию активации денатурации ( $E_d$ ) определяли из графика Аррениуса (зависимости натурального логарифма  $k_D$  от  $1/T$ ) [12]. Изменение энтальпии активации денатурации ( $\Delta H^\ddagger$ ), изменение энтропии активации денатура-

ции ( $\Delta S^\ddagger$ ) и изменение свободной энергии Гиббса ( $\Delta G^\ddagger$ ) рассчитывали из графика Эйринга (зависимости натурального логарифма  $k_D / T$  от  $k_D / T$ ) [13].

Статистическая обработка результатов измерений проводилась в программе Microsoft Office Excel 2003. Применяя *t*-критерий Стьюдента, экспериментально полученные данные оценивались как статистически достоверные при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Для улучшения термостабильных свойств  $\alpha$ -амилазы *Bacillus* sp. 406 (AB406) нами был осуществлен поиск целевых участков для сайт-специфического мутагенеза. Уровень гомологии последовательности AB406 с другими изученными  $\alpha$ -амилазами, выделенными из бактерий рода *Bacillus* (75 % идентичных аминокислот и ниже) не позволяет со всей определенностью выделить остатки, изменение которых могло бы приблизить термостабильность AB406 к значениям, характерным для высокотермостабильных  $\alpha$ -амилаз *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *Geobacillus stearothermophilus*.

Основываясь на сравнении аминокислотных последовательностей и моделировании трехмерной структуры AB406, нами было выявлено наличие остатков Arg177-Gly178, аналогичных остаткам Arg176-Gly177 в структуре ВАА, участвующим в образовании дестабилизирующей петли [3]. Кроме того, в AB406 присутствовали остатки Asn191 и Gly210, замены которых в аналогичных положениях в ВЛА (Asn190Phe и Ala209Val соответственно) повышали стабильность последней [2]. Точечные замены Asn191Phe и Gly210Val и удаление остатков в положениях 177–178 были выбраны для повышения температурной стабильности AB406.

Для введения мутаций в вышеназванные участки в плазмидную ДНК рALTER-1 по сайту рестрикции *Hind*III встраивали фрагмент ДНК, содержащий ген AB406 [7]. Плазмидную ДНК рALTER-1::*amy*406 подвергали денатурации и гибридизации с мутагенными олигонуклеотидами, обрабатывали ДНК-полимеразой и ДНК-лигазой фага T4 и трансформировали ею клетки *E. coli* ES1301*mutS*. Сегрегацию исходных и мутантных вариантов плазмид проводили в клетках *E. coli* JM109. Отбор плазмид, содержащих измененные варианты гена *amy*406 проводили с помощью секвенирования. В результате были получены мутантные варианты AB406, содержащие аминокислотные замены Asn191Phe, Gly210Val или делецию dRG.

Первоначально нами было исследовано влияние введенных мутаций на pH-профиль мутантных ферментов. Значения активности мутантных вариантов dRG, Asn191Phe и Gly210Val при pH реакционной среды от 4 до 10 статистически не отличались от таковых для AB406 дикого типа.

Эффект введенных мутаций на профиль температурной стабильности AB406 показан на рис. 1. Аминокислотная замена Gly210Val выражается в незначительном увеличении термостабильности фермента по сравнению с ферментом дикого типа. Температура полуинактивации ( $T_m$ ) мутантной амилазы увеличилась лишь до 55 °С, в то время как  $T_m$  амилазы дикого типа рав-

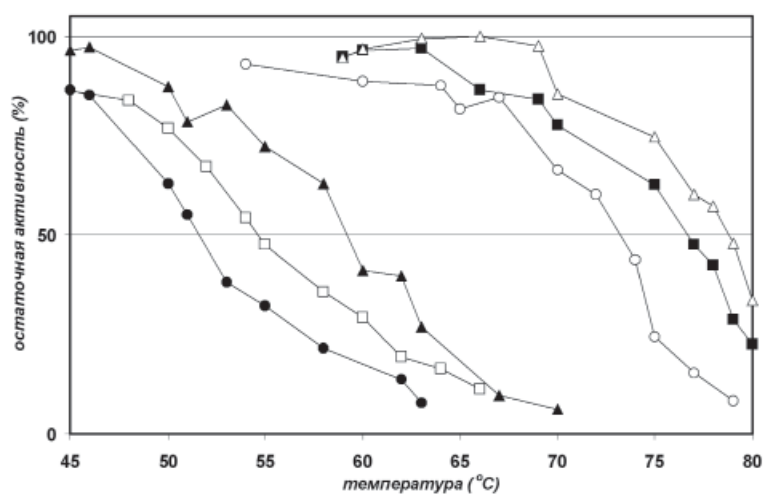


Рис. 1. Профили температурной стабильности вариантов амилазы штамма *Bacillus* sp. 406: ● – дикий тип; □ – мутант G210V; ▲ – мутант N191F; ○ – мутант dRG; ■ – мутант dRG-N191F; Δ – мутант dRG-N191F-G210V

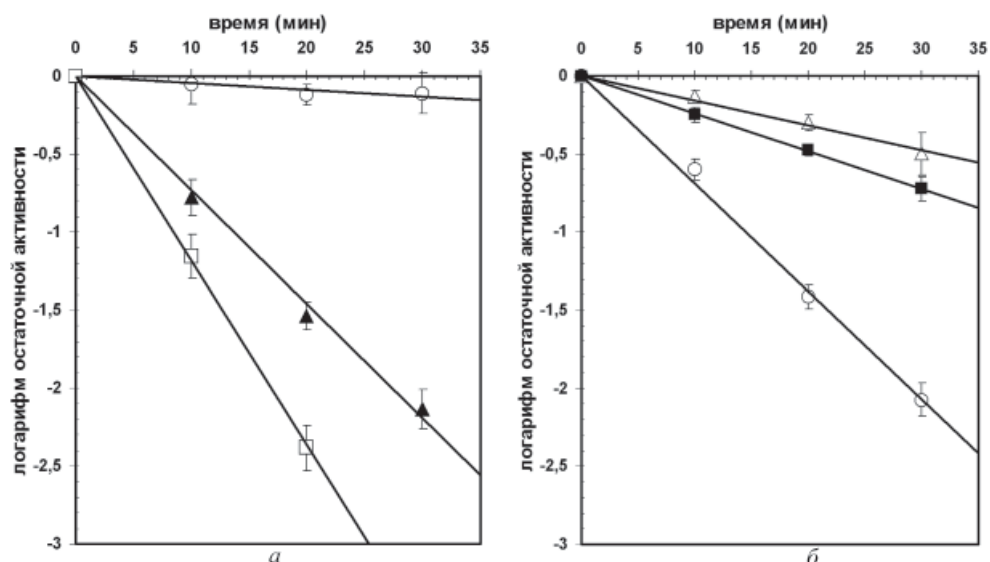


Рис. 2. Временная зависимость температурной инактивации (среднее арифметическое логарифма остаточной активности  $\pm$  стандартное отклонение) амилазы штамма *Bacillus* sp. 406 дикого типа ( $\square$ ) и её вариантов G210V ( $\blacktriangle$ ), dRG ( $\circ$ ), dRG-N191F ( $\blacksquare$ ), dRG-N191F-G210V ( $\triangle$ ) при 60 (а) и 75 °C (б)

на 52 °C.  $T_m$  варианта с заменой Asn191Phe увеличилась до 59 °C. Удаление аминокислот Arg177-Gly178 в амилазе штамма *Bacillus* sp. 406 приводило к увеличению  $T_m$  фермента до 71,6 °C.

Исследование кинетики температурной инактивации проводили в диапазоне температур 50–60 °C для вариантов Asn191Phe и Gly210Val, и в диапазоне 60–75 °C для варианта dRG, ввиду мощного стабилизирующего эффекта делеции. Полученные значения остаточной активности были представлены в виде натуральных логарифмов (рис. 2), что позволило рассчитать значения константы скорости инактивации ( $k_D$ ) фермента и другие параметры этого процесса при различных температурах. Рассчитанные константы представлены в табл. 1. Эти данные позволили сделать вывод о том, что аминокислотная замена Gly210Val незначительно повышает параметры термостабильности по сравнению с ферментом дикого типа. Энергия активации денатурации ( $E_a$ ) этого варианта возросла на 3 кДж/моль, а время полуинактивации ( $t_{1/2}$ ) при 50 °C увеличилось лишь на 18 мин по сравнению с исходной амилазой. Положительный эффект мутаций Gly210Val на термостабильность АВ406, вероятно, объясняется, аналогично эффекту замены Ala209Val в ВLА, улучшением упаковки гидрофобного ядра молекулы [2].

Т а б л и ц а 1. Кинетические и термодинамические характеристики вариантов амилазы штамма *Bacillus* sp. 406

Вариант фермента АВ406	Дикий тип	G210V	N191F	dRG	dRG-N191F	dRG-N191F-G210V
$T_m$ (°C)	52,35	55,5	58,85	71,6	75,8	78,4
$k_D$ при 50 °C (мин <sup>-1</sup> )	0,0255	0,0152	0,0068	0,0226	0,0108	0,0074
$t_{1/2}$ при 50 °C (мин)	27,18	45,59	101,91	30,66	64,17	93,65
$E_a$ (кДж/моль)	137,61	140,76	160,75	171,14	194,27	198,44
$\Delta H^\ddagger$ (кДж/моль)	134,89	138,03	158,02	168,31	191,38	195,55
$\Delta S^\ddagger$ (Дж/моль·К)	141,86	146,91	202,43	214,31	273,49	282,32
$\Delta G^\ddagger$ при 50 °C (кДж/моль)	89,04	90,55	92,61	94,77	97,54	98,67

П р и м е ч а н и е. Для вариантов dRG, dRG-N191F, dRG-N191F-G210V представлены значения  $k_D$ ,  $t_{1/2}$  и  $\Delta G^\ddagger$  при 70 °C.

Эффект аминокислотной замены Asn191Phe также выражался в повышении термостабильности АВ406. Энергия активации денатурации ( $E_a$ ) этого мутантного варианта увеличилась на 23 кДж/моль. Время полуинактивации ( $t_{1/2}$ ) при 50 °C возросло с 27 до 102 мин по сравнению с ферментом дикого типа. Вероятно, аналогично эффекту аминокислотной замены Asn190Phe

в BLA стабилизирующий эффект замены Asn191Phe в АВ406 связан с усилением взаимодействия между ароматическими остатками и удалением потенциально способного к деамидированию остатка аспарагина [2].

Мутация dRG также приводила к сильному повышению стабильности АВ406 при высоких температурах. Энергия активации денатурации ( $E_a$ ) мутанта dRG увеличилась на 33 кДж/моль, время полуинактивации ( $t_{1/2}$ ) при 60 °С возросло с 6 до 157 мин. Таким образом, среди всех проведенных мутационных изменений, удаление остатков Arg177-Gly178 оказывало наивысший стабилизирующий эффект на АВ406.

Удаление двух аминокислотных остатков в аналогичных положениях, как указывалось выше, приводило к повышению стабильности многих  $\alpha$ -амилаз. Предполагают, что это может быть объяснено укорочением и следовательно уменьшением ригидности выступающей петли, находящейся вблизи одного из  $\text{Ca}^{2+}$ -ионов, участвующих в упорядочивании третичной структуры фермента [5].

Для объединения положительных эффектов введенных в исследовании мутаций, на основе мутантного варианта dRG был получен вариант dRG-N191F с заменой Asn191Phe. Затем в данный ген была введена третья повышающая стабильность замена – Gly210Val. Для полученных мутантных вариантов также были рассчитаны кинетические и термодинамические параметры температурной инактивации (табл. 1).

Оказалось, что эффект всех трех мутаций является аддитивным. Вариант dRG-N191F, объединявший в себе две мутации, обеспечивающие прирост  $E_a$  на 33 кДж/моль и 23 кДж/моль соответственно, обладал  $E_a$  равной 194 кДж/моль. Температура полуинактивации ( $T_m$ ) двойного мутанта увеличилась до 76 °С. Время полуинактивации ( $t_{1/2}$ ) при 70 °С возросло до 64 мин, а при 60 °С – до 526 мин. Конечный вариант dRG-N191F-G210V, включающий три стабилизирующие мутации, позволил достигнуть  $E_a$  равной 198 кДж/моль. Время полуинактивации ( $t_{1/2}$ ) достигло 64 и 818 мин при 70 и 60 °С соответственно. Полученные результаты позволили приблизить АВ406 к уровню термостабильности  $\alpha$ -амилаз *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis* (табл. 2) [14].

Т а б л и ц а 2. Сравнение параметров термостабильности различных  $\alpha$ -амилаз

Источник $\alpha$ -амилазы	$E_a$ (кДж/моль)	$T_m$ (°С)
<i>B. sp.</i> 406 (вариант dRG-N191F-G210V)	198,4	78
<i>B. subtilis</i>	262,0	86
<i>B. amyloliquefaciens</i> (BAA)	255,4	86
<i>B. licheniformis</i> (BLA)	363,7	102

Другим важным выводом является тот факт, что стабилизационные эффекты аминокислотных замен Asn191Phe и Gly210Val на АВ406, изначально не обладающую высокой термостабильностью, количественно сопоставимы с эффектами аналогичных мутаций, введенных в исходно высокотермостабильный фермент BLA [2]. Замена Asn-Phe обеспечила повышение  $T_m$  приблизительно на 5 °С для обоих ферментов, замена Gly-Val (Ala-Val в BLA) – на 3 °С. Это позволяет предположить, что данные мутации, также как и делеция, аналогичная удалению Arg176-Gly177 в BAA, могут быть применимы для повышения термостабильности других ферментов, имеющих сходные структурные особенности.

**Закключение.** Применение метода сайт-специфического мутагенеза позволило нам значительно улучшить термостабильность  $\alpha$ -амилазы штамма *Bacillus sp.* 406. После введения в ген фермента трех мутаций уровень температурной устойчивости фермента был приближен к значениям, характерным для промышленных термостабильных  $\alpha$ -амилаз. Это расширяет возможности использования данного фермента в промышленных биотехнологических процессах.

## Литература

1. Guzman-Maldonado H., Paredes-Lopez O. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1995. Vol. 35, N 5. P. 373–403.
2. Declerck N., Machius M., Joyet P. et al. // Protein Eng. 2003. Vol. 16, N 4. P. 287–293.

3. Suzuki Y., Ito N., Yuuki T. et al. // J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264, N 32. P. 18933–18938.
4. Hagihara H., Igarashi K., Hayashi Y. et al. // J. Appl. Glycosci. 2002. Vol. 49, N 3. P. 281–289.
5. Ben Ali M., Khemakhem B., Robert X. et al. // Biochem. J. 2006. Vol. 394. P. 51–56.
6. Shiau R. J., Hung H. C., Jeang C. L. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. Vol. 69, N 4. P. 383–385.
7. Качан А. В., Русь О. Б., Евтушенко А. Н. // Тр. БГУ. 2009. Т. 4, ч. 1. С. 174–181.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., 1984. С. 116, 162–167, 241–242, 333–335.
9. Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T. // Bioinformatics. 2006. Vol. 22, N 2. P. 195–201.
10. Neu H. C., Heppel L. A. // J. Biol. Chem. 1965. Vol. 240, N 9. P. 3685–3692.
11. Miller G. L. // Anal. Chem. 1959. Vol. 31, N 3. P. 426–429.
12. Marangoni A. G. Enzyme Kinetics: A Modern Approach. New York, 2003. P. 141–144.
13. Lee S., Oneda H., Minoda M. et al. // J. Biochem. 2006. Vol. 139, N 6. P. 997–1005.
14. Duy C., Fitter J. // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, N 45. P. 37360–37365.

A. V. KACHAN, A. N. EVTUSHENKOV

av.kachan@mail.ru

## VARIANTS OF $\alpha$ -AMYLASE FROM *BACILLUS* SP. 406 WITH ENHANCED THERMOSTABILITY

### Summary

Several mutations were known to increase the thermostability of  $\alpha$ -amylase of *B. licheniformis* and other amylases. A method of site-specific mutagenesis was used to introduce similar mutations in a sequence of *Bacillus* sp. 406  $\alpha$ -amylase (AB406) gene. The influence of the mutations on the thermostability of enzyme was studied. It was shown that substitutions Asn191Phe and Gly210Val increased the half-inactivation temperature ( $T_m$ ) of the enzyme from 52.4 to 58.9 and 55.5 °C, respectively, in comparison with the wild-type enzyme. Deletion of 177Arg-178Gly resulted in the increase of  $T_m$  of AB406 to 71.6 °C. The effect of given mutations, including the substitution of Asn191Phe, was additive.  $T_m$  of the AB406 variant with three mutations reached 78.4 °C, and the half-life ( $t_{1/2}$ ) at 70 °C was raised to more than 93 minutes.