

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ НЕНАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА БАКТЕРИАЛЬНОЙ АЛЬФА-АМИЛАЗЫ

Ушмаева У.А.<sup>1,2</sup>

Научный руководитель – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Селиханов Г.К.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Университет ИТМО

<sup>2</sup>Альметьевский государственный технологический университет

«Высшая школа нефти»

Ulianka102@yandex.ru

### Введение

Альфа-амилазы ( $\alpha$ -амилазы, КФ 3.2.1.1) - ферменты, катализирующие реакции гидролиза  $\alpha$ -1,4-гликозидных связей в молекулах крахмала с образованием декстринов, олиго- и моносахаридов. Спрос на  $\alpha$ -амилазу увеличивается с каждым годом благодаря ее использованию в пищевой, текстильной, химической и других отраслях промышленности [1]. Разработка промышленных  $\alpha$ -амилаз сталкивается с рядом проблем, связанных с высокой себестоимостью получения ферментных препаратов, низкой термостабильностью и специфической активностью, а также чувствительностью ферментов, встречающихся в природе, к ионам металлов. Для решения данных проблем используются методы генной инженерии: гомологичная и негомологичная рекомбинации, сайт-направленный мутагенез, адаптивная эволюция и ненаправленный мутагенез. Физико-химический мутагенез обеспечивает высокую частоту мутаций за счет модификации азотистых оснований в результате определенных химических реакций и образования пиримидиновых димеров. Это приводит к изменениям в последовательности ДНК, что позволяет получать новые штаммы с уникальными точечными заменами и измененным метаболизмом. Кроме того, полученные эффективные мутантные штаммы можно подвергать дальнейшей модификации методами генной инженерии. В данном исследовании рассматривается влияние мутагенных факторов на продукцию бактериальной  $\alpha$ -амилазы штаммом *Bacillus amyloliquefaciens* B-759.

### Основная часть

В качестве природного продуцента  $\alpha$ -амилазы использовался штамм *B.amyloliquefaciens* B-759 - хорошо изученный продуцент мезофильной  $\alpha$ -амилазы [2]. Для получения вариантов штамма, вырабатывающих увеличенное количество целевого фермента, выбраны методы физико-химического мутагенеза с использованием этилметансульфоната (EMS) и ультрафиолетового облучения [3]. Культивирование природного штамма-продуцента и мутантных клонов проводилось на среде LB при температуре 35-37°C и высокой аэрации (150 об/мин). Для селекции эффективных клонов-продуцентов на чашках Петри и дальнейшего измерения амилазной активности использовался йодно-крахмальный метод. По итогам физико-химического мутагенеза смертность культуры составила 90-99% и наблюдались видимые фенотипические изменения полученных колоний. В ходе работы было проанализировано 185 мутантных клонов, из которых 3 показали увеличенную скорость роста и повышенную продукцию целевого фермента. Прирост активности составил от 22 до 34% в сравнении с контрольным штаммом. Полученные мутантные варианты выбраны для дальнейших работ по физико-химическому мутагенезу.

### Выводы

Полученные результаты доказывают работоспособность методов физико-химического мутагенеза для создания эффективных штаммов-продуцентов ценных метаболитов без использования методов генетической инженерии. Исследование может внести значительный вклад в развитие биотехнологической промышленности и способствовать увеличению производства отечественных ферментативных препаратов.

### Литература

1. Hussain M., Jabbar B. Applications of Alpha ( $\alpha$ )-Amylase in Biotechnology: A Review // GU Journal of Phytosciences. 2021. Vol. 1. P. 98-105.
2. Батаева Ю.В., Похиленко В.Д., Дунайцев И.А., Текутов А.Р., Калмантаев Т.А. Перспективы применения *Bacillus amyloliquefaciens* в биоконтроле, метаболической инженерии и экспрессии белка (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2025. Т. 61. №3. С. 221-235.
3. Karakus B., Korkmaz I., Demirci K., et al. A combined treatment using ethylmethanesulfonate and ultraviolet light to compare amylase production by three *Bacillus* sp. Isolates. // Prep Biochem Biotechnol. 2018. Vol. 48. P. 815–822.