

# АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ ВИКОРИСТАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ БАКТЕРІАЛЬНИХ ШТАМІВ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ПРОДУКТИВНОСТІ ПУЛУЛАЗИ

Бабко О.М.

КПІ ім. І. Сікорського, babko.olga@iit.kpi.ua

## Abstract

*Bacillus subtilis* WB800, WB600, BS001 and *Escherichia coli* BL 21 have shown promise in enhancing pululanase productivity. Introduction of pululanase-encoding genes into their genomes significantly increased enzyme activity. Optimization of cultivation conditions further boosted activity, demonstrating potential for industrial-scale production and diverse biotechnological applications.

**Keywords:** pululanase, recombinant, enzyme production, cultivation

**Вступ.** В останні роки велика увага наукової спільноти приділяється пошуку ефективних методів отримання ферментів з високою активністю для використання в різних галузях промисловості, медицини та науки.

Одним із таких ферментів є пулулаза, що каталізує гідроліз  $\alpha$ -1,6-глікозидних зв'язків у точці відгалуження, а також в лінійному ланцюзі ряду олігосахаридів і полісахаридів, розщеплює пулулан до мальтотріози, діє на амілопектин, глікоген та декстрини.

Пулулаза I може ефективно гідролізувати  $\alpha$ -1-6-гліколітичні зв'язки в пулулані, тоді як пулулаза II може бути більш універсальною, розщеплюючи  $\alpha$ -1-4- і  $\alpha$ -1-6-гліколітичні зв'язки в амілопектині.

Різноманітність типів пулулаз та їх властивостей створюю широкий спектр можливостей для їхнього використання. Вони знаходять застосування у виробництві замінників цукру, харчовій промисловості для поліпшення текстури продуктів, у пивоварінні для зменшення в'язкості сусла, а також у виробництві синтетичних мийних засобів, де сприяють розщепленню складних вуглеводів.

Це зумовлює підвищений інтерес до їх промислового виробництва, що на даний момент залишається недостатньо розвиненим. Отож, зростаючий попит на пулулази та їх широкий спектр застосування вказує на необхідність пошуку ефективних продуцентів пулулаз.

У цьому контексті дослідники активно вивчають можливість використання рекомбінантних мікроорганізмів для виробництва пулулази. Одним із таких підходів є введення генів, які кодують пулулазу, до геномів штамів бактерій, таких як *Bacillus subtilis* та *Escherichia coli*.

У даному огляді представлено результати досліджень, що описують використання рекомбінантних штамів *B. subtilis* WB800, WB600, BS001 та *E. coli* BL 21 для отримання пулулази з підвищеною активністю. Також розглянуто вплив різних умов культивування та підживлення на активність пулулази, що синтезується цими штамми. Дослідження зазначених аспектів має важливе значення для подальшого розвитку біотехнологічних процесів та виробництва пулулази з покращеними характеристиками, що може сприяти розвитку нових промислових та медичних застосувань цього ферменту.

Тому метою роботи є визначення ефективності використання рекомбінантних штамів для виробництва пулуланази з високою активністю.

**Матеріали та методи.** Для вибору перспективного продуцента пулуланази було використано метод порівняльного аналізу характеристик рекомбінантних штамів *B. subtilis* WB800, WB600, BS001 та *E. coli* BL 21. Вибір штамів базувався на аналізі літературних даних, що стосуються новітніх досліджень продуцентів пулуланази.

**Результати та обговорення.** У роботі [1] зазначено, що шляхом введення гену, який кодує пулулазу, в геноми штамів *B. subtilis* WB800 та WB600, вдалося підвищити активність пулуланази до рівнів  $30,32 \cdot 10^3$  ОД/л та  $18,83 \cdot 10^3$  ОД/л у випадку вирощування рекомбінантних штамів *B. subtilis* WB800-РНраII-pul та *B. subtilis* WB600-РНраII-pul, відповідно. Після оптимізації умов культивування, а саме кількості інокуляту, температури інкубування, швидкості струшування та початкового рН, для *B. subtilis* WB800-РНраII-pul активність пулуланази досягла  $60,85 \cdot 10^3$  ОД/л. Це свідчить про успішність введення гену пулуланази до геному даних штамів та можливість подальшої оптимізації умов культивування для підвищення продукції цього ферменту [1].

Термостабільну пулулазу періодичною ферментацією з використанням підживлення за допомогою рекомбінантного штаму *E. coli* BL 21 було отримано у дослідженні [2]. Воно показало, що застосування різних стратегій контролю кисню, глюкози та тиску у ферментері може впливати на ріст клітин і синтез пулуланази.

*Escherichia coli* BL 21 використовували для виробництва кДНК пулуланази, отриманої з термофільного штаму *Thermotoga lettingae* ТМО. У середовищі культивування було додано глюкозу у концентрації 25 г/л як основний субстрат, а також підживлюючий розчин глюкози з концентрацією 800 г/л. Процес культивування відбувалося при температурі 34 °С зі швидкістю аерації 2 об/об/хв, рН середовища на рівні 6,9 та швидкістю перемішування 300-1200 об/хв. Виявлено, що зі збільшенням тиску у ферментері здатність до перенесення кисню зростає, проте ріст клітин та синтез пулуланази гальмується. Дані умови культивування сприяли досягненню найвищих значень біомаси та активності пулуланази - відповідно 55,1 г/л та  $412 \cdot 10^3$  ОД/л, що робить цей штам потенційно важливим для промислового виробництва пулуланази [2].

Застосування рекомбінантного штаму *B. subtilis* BS001 дало змогу отримати пулулазу з активністю  $440 \cdot 10^3$  ОД/л після заміни мальтозного сиропу та порошку соєвого шроту на дешевий кукурудзяний крохмаль та кукурудзяний лікер в якості джерел вуглецю та азоту [3].

Потім у даному дослідженні вивчалася можливість культивування *B. subtilis* BS001 у біореакторах об'ємом 50 л та  $50 \cdot 10^3$  л. При періодичному культивуванні за введення 60 г/л кукурудзяного крохмалю та 18 г/л кукурудзяного лікеру при температурі 37 °С, аерації 1 об/об/хв та швидкості перемішування 500 об/хв протягом 80 годин активність пулуланази становила  $896 \cdot 10^3$  ОД/л. У той час, коли при забезпеченні підживлення культури (за допомогою перистальтичного насоса додавали кукурудзяний крохмаль для

підтримки вмісту редукуючих цукрів на рівні близько 0,5% протягом всього процесу культивування) активність ферменту досягла  $1743 \cdot 10^3$  ОД/л, завдяки регулюванню розчиненого кисню, рН (в межах 6,5-7,0), вмісту цукру та температури. Під час подальшого зберігання пулулантази при кімнатній температурі (25 °С) протягом 6 місяців, активність ферменту складала більше 90%. Періоди напіврозпаду при температурах 60 та 80 °С становили відповідно 119,45 годин та 51,18 годин [3].

Тобто, оптимізація умов культивування *Bacillus subtilis* WB800, WB600 та *Escherichia coli* BL 21 сприяла подальшому підвищенню активності пулулантази, досягненню оптимальних умов для росту клітин та синтезу ферменту. Використання різних стратегій контролю кисню, глюкози та тиску у ферментері також виявилось важливим для забезпечення оптимальних умов культивування та максимальної продуктивності пулулантази. Також було продемонстровано можливість підтримання високої активності пулулантази, отриманої за допомогою *B. subtilis* BS001, під час зберігання протягом тривалого періоду.

З вище наведених даних випливає, що серед всіх проаналізованих продуцентів найвищу активність при періодичному культивуванні без підживлення показав штам *B. subtilis* BS001 і вона становила  $896 \cdot 10^3$  ОД/л. При цьому забезпечення підживлення культури *B. subtilis* BS001 майже вдвічі підвищило активність пулулантази порівняно з періодичною культурою без підживлення. Результати культивування *B. subtilis* BS001 в біореакторах різного об'єму свідчать про можливість масштабування процесу для промислового виробництва пулулантази.

**Висновки.** У результаті проведених досліджень з рекомбінантними штамми бактерій, такими як *Bacillus subtilis* WB800, WB600, BS001 та *Escherichia coli* BL 21 вдалося успішно підвищити активність пулулантази шляхом введення генів, що кодують цей фермент, до їх геномів.

Найбільш ефективним для промислового виробництва пулулантази виявився рекомбінантний штам *B. subtilis* BS001 з можливістю масштабування процесу та отримання високої активності ферменту при культивуванні з підживленням. Цей штам також продемонстрував високу термостабільність пулулантази. Загалом, рекомбінантні штами бактерій показали великий потенціал для виробництва пулулантази з використанням різних стратегій культивування та оптимізації умов. Отримані результати свідчать про перспективність використання рекомбінантних штамів бактерій у промисловому виробництві пулулантази.

### Список використаної літератури:

1. Wang Y., Chen S., Zhao X., Zhang Y., Wang X., Nie Y., Xu Y. Enhancement of the production of *Bacillus naganoensis* pullulanase in recombinant *Bacillus subtilis* by integrative expression. Protein Expression and Purification. 2019. doi:10.1016/j.pep.2019.03.006.
2. Chi L., Wei J., Hou J., Wang J., Hu X., He P., Wei T. Optimizing the DO-stat protocol for enhanced production of thermostable pullulanase in *Escherichia coli* by using oxygen control strategies. Journal of Food Biochemistry. 2020. doi:10.1111/jfbc.13173.
3. Meng F., Zhu X., Zhao H., Lu F., Lu Y., Lu Z. Improve Production of Pullulanase of *Bacillus subtilis* in Batch and Fed-Batch Cultures. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2020, 193(1): P. 296–306. doi:10.1007/s12010-020-03419-2.