bacteria *Pseudomonas* and *Shewanella*. According to the literature, the presence of this group of enzymes can be associated with adaptation to low-temperature habitant conditions. Several Gram-positive bacteria (*Micrococcus luteus, Carnobacteriuminers, Agrococcus*sp., *Arthrobacter* sp.) produce amylolytic and cellulolytic enzymes. Different groups of proteolytic enzymes are well expressed in *Pseudomonas lundensis*, *Shewanellabaltica*. Some bacteria appeared urease-positive - this indicates that these isolates are resistant to alkaline medium, use urea and grow at pH 11. These include *Sporosarcinapsychrophila*, *Brachybacterium* sp. and some species like *Pseudomonas*. Such adaptive capacity can be associated with environmental conditions (water or soil). Some isolates have been found to have nuclease activity as a possible mechanism of protection against phages or nucleic acids. Thus, the ability to cleave DNA has isolates 6t.2.5, 6t.4.5 that are not identified at the moment. It is also present, but less expressed, in *Carnobacteriuminers*. Pectolytic activity is not possessed by any of the studied isolates.

It should be noted, that the search for bacteria that have high catalytic activity at low temperatures is of industrial importance to the use of these enzymes in many sectors of the national economy, as well as for wastewater treatment. Therefore, we consider it promising to further study Antarctic isolates as potential producers of enzymes that work best at low temperatures.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА ДЛЯ ОТКЛЮЧЕНИЯ КАТАБОЛИТНОЙ РЕПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО ГЕНА α-АМИЛАЗЫ В КЛЕТКАХ *BACILLUSSUBTILIS*

И.Ю. Бакутенко, А.В. Качан

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
bakutenko_ivan@mail.ru

Бактерии *Bacillussubtilis* широко применяются в качестве продуцентов термостабильных α-амилаз. Уровень экспрессии генов, кодирующих данные белки, в клетках *Bacillus* контролируется с помощью механизма катаболитной репрессии, опосредованной транскрипционным регулятором CcpA. Наличие в среде ферментации легко метаболизируемых моно- и дисахаридов приводит к подавлению транскрипции генов α-амилаз [1]. Для повышения уровня продукции перспективным является получение

кодирующих амилазы генов, не подверженных катаболитной репрессии в клетках *Bacillus*.

После компьютерного анализа последовательности гена *amyM3,* кодирующего термостабильную αамилазу *B. flexus*[2], с помощью программ FIMO и SigmoID, было выявлено несколько участков, напоминающих сайт связывания белка CcpA. Был проведён мутагенез участка TGGTAACGTTTACA, проявляющего наибольшее сходство с консенсусной последовательностью, с заменой центрального динуклеотидаCG на AA [3]. Мутантный ген, названный *cre3,* был субклонирован в векторе pAL-1, после чего полученной конструкцией, а также плазмидойс исходным геном, трансформировали клетки *B. subtilis*168. Вкультуре бактерий с плазмидойрAL1::*amyM3* активность α-амилаз через 10 ч культивирования достигала 0,461(±0,0069) ед./мл, при добавлении глюкозы наблюдалась репрессия биосинтеза α-амилазы – активность фермента составляла 0,017(±0,004) ед./мл. Вопреки ожиданиям, угнетение продукции фермента наблюдалось также при внесении глюкозы в культуру бактерий *B. subtilis*168, содержащих плазмидурAL-1::*cre3*. Активность ферментов через 10 ч культивирования без глюкозы составляла 0,255(±0,018) ед./мл, при добавлении углевода – 0,0219(±0,0007) ед./мл. Значения оптических плотностей культур бактерий с рекомбинантными плазмидами значимо не отличались.

Таким образом, замена центрального динуклеотидаCG на AA в вероятном сайте *cre* гена α-амилазы существенно не повлияла на репрессию синтеза фермента в присутствии глюкозы. Это может быть обусловлено: распознаванием гена *amyM3* другими белками-регуляторами; ключевой ролью альтернативного сайта *cre,* расположенного ниже стартового кодона; либо неэффективностью данной мутации для интерференции связывания репрессорного комплекса с *cre*-сайтом. Для уточнения механизма катаболитной репрессии α-амилазного гена нами был создан штамм *B. subtilis* Δ*ccpA* с инактивированным геном *ccpA.* Для этого был сконструирован суицидный вектор pMTL21c-*ccpA*-*Em,* трансформация которым клеток*B. subtilis*168приводила к изменению морфологии и скорости роста колоний в присутствии в среде глюкозы [1]. Наблюдаемый фенотип, совместно с результатами ПЦР-анализа локуса *ccpA*в клетках трансформантов, подтверждает получение штамма *B. subtilis* Δ*ccpA*. Штамм будет использован для дальнейшего изучения катаболитной репрессии гена *amyM3.*

Работа выполнена в рамках задания 3.12 ГПНИ “Биотехнологии”, подпрограмма “Микробные биотехнологии” 2016–2018 гг., № госрегистрации 20161703.

1. Fujita, Y. Carbon Catabolite Control of the Metabolic Network in *Bacillus subtilis* / Y. Fujita // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2009. – Vol. 73, No 2. – P. 245–259.

2. Kachan, A.V. Thermostable mutant variants of *Bacillus* sp. 406 α-amylase generated by site-directed mutagenesis / A.V. Kachan, A.N. Evtushenkov // Central European Journal of Biology – 2013. – Vol. 8, No 4. – P. 346–356.

3. Weickert, M.J. Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis* / M.J. Weickert, G.H. Chambliss // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1990. – Vol. 87, No 16– P. 6238–6242.

APPLICATION OF SITE-DIRECTED MUTAGENESIS FOR SWITCHING OFF THE CATABOLITE REPRESSION OF THE HETEROLOGOUS αAMYLASE GENE IN *BACILLUS SUBTILIS* CELLS

I.Y. Bakutenko, A.V. Kachan

Belarusian State University, Minsk, Belarus

bakutenko_ivan@mail.ru

Bacillus subtilis bacteria are widelyused as producers of thermostable α-amylases. The promising approach to increase the level of α-amylase production is obtaining of α-amylase genes that are not subject to catabolite repression in *Bacillus* cells.

In this study we showed that substitution of central dinucleotide CG by AA in the bioinformatically predicted *cre*site of *B. flexus*406 α-amylase gene does not switch off glucose catabolite repression of this gene in *B. subtilis* 168 cells. For further clarifying the mechanism of catabolic repression of the α-amylase gene, we received *B. subtilis*Δ*ccpA* strain with disrupted gene of catabolite repressor protein *ccpA* by transformation of *B. subtilis* 168 cells with suicidal vector pMTL21c-*ccpA*-*Em*.