

УДК 579.852.11

**СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *Bacillus subtilis*
С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ГЕНОМ
ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ *Bacillus intermedius***

Ю.В. Данилова, Н.П. Балабан, Т.Р. Шамсутдинов,
А.М. Марданова, М.Р. Шарипова

Аннотация

Известно, что на биосинтез протеиназ оказывают влияние условия культивирования продуцента. Показано, что на среде с рН 7.7 продукция фермента в 5 раз выше, чем на среде с рН 8.5, традиционно используемой для биосинтеза многих гидролитических ферментов, в том числе и протеиназ, у исходного штамма *B. intermedius* 3-19 и рекомбинантных штаммов *B. subtilis* AJ73. Максимальная продуктивность исследуемого рекомбинантного штамма в отношении синтеза глутамилэндопептидазы наблюдается при соотношении объема среды к объему колбы 1:4.

Ключевые слова: *B. subtilis*, *B. intermedius*, рекомбинантный штамм, биосинтез, глутамилэндопептидаза.

Введение

Изучению протеолитических ферментов микроорганизмов уделяется большое внимание в связи с их широким использованием в различных областях промышленности, медицины и фундаментальных научных исследованиях. Актуальными продуцентами для получения протеолитических ферментов являются представители рода *Bacillus* – непатогенные и легко культивируемые микроорганизмы. Среди секретируемых протеаз бацилл особый интерес представляют глутамилэндопептидазы, относящиеся к клану химотрипсиноподобных ферментов с узкой субстратной специфичностью, которые гидролизуют пептидные связи по строго определенным сайтам – глутаминовой или аспарагиновой аминокислотным остаткам.

Впервые глутамилэндопептидаза обнаружена у *Staphylococcus aureus* V8, позднее – у стрептомицетов, бацилл и вирусов [1, 2]. Многие из этих ферментов получены в гомогенном состоянии, изучены их каталитические и энзиматические свойства, субстратная специфичность, известны полные аминокислотные последовательности, получена пространственная структура некоторых глутамилэндопептидаз. Нами ранее изучены свойства глутамилэндопептидазы, выделенной из бактерий *Bacillus intermedius* 3-19 в фазе замедления роста и стационарной фазе роста [3, 4], а также изучены условия биосинтеза [5–8] и структура белка [9, 10]. Тем не менее остается открытым вопрос о физиологической роли этого фермента в клетках бацилл, мало сведений о механизмах

регуляции биосинтеза фермента, о генетическом контроле экспрессии соответствующего гена. При исследовании регуляции биосинтеза белка перспективным является применение методов геной инженерии. Ген глутамилэндопептидазы *B. intermedius* 3-19 клонирован и изучена его экспрессия в клетках штамма *Bacillus subtilis* AJ73, из хромосомы которого делетированы гены собственных внеклеточных протеиназ. В этот штамм были трансформированы плазмиды pV и Δ58.21, несущие ген глутамилэндопептидазы *B. intermedius* *gse* Vi под собственным промотором [9] и различающиеся по размеру вставки хромосомной ДНК. При исследовании закономерностей биосинтеза глутамилэндопептидазы обоими рекомбинантными штаммами обнаружены различия в механизмах регуляции биосинтеза фермента, секретируемого в фазе замедления (ранний фермент) и поздней стационарной фазе роста (поздний фермент) [12–14]. Было показано, что биосинтез ранней глутамилэндопептидазы регулируется механизмом катаболитной репрессии, тогда как в поздней стационарной фазе роста не происходит репрессии биосинтеза поздней глутамилэндопептидазы, что, связано со сменой механизмов регуляции синтеза фермента при переходе культуры к спорообразованию. Механизмы регуляции определяются структурной организацией промоторной области гена. Получены мутанты гена *gse* Vi с делецией в регуляторной области, приводящей к уменьшению промотора до 100 п.н. до точки начала транскрипции.

Целью настоящей работы явилось разработка условий культивирования и подбор основных компонентов питательной среды для максимальной продукции глутамилэндопептидазы *B. intermedius* 3-19, секретируемой в стационарной фазе рекомбинантным штаммом *B. subtilis*, несущим на плазмиде pk-1 модифицированный ген *gse* Vi.

1. Материалы и методы

В качестве штамма-реципиента использовали штамм *B. subtilis* JB 20-36, из хромосомы которого делетированы гены собственных внеклеточных протеиназ. В работе использовали плазмиду, в которую встроен ген глутамилэндопептидазы *B. intermedius* 3-19 с делецией в регуляторной области. Плазида и штамм-реципиент любезно предоставлены для проведения работы профессором С.В. Костровым (Институт молекулярной генетики РАН, г. Москва). Трансформацию клеток *B. subtilis* плазмидной ДНК проводили по методике изложенной в работе [15]. Для идентификации трансформированных клеток их высевали на молочный агар (голодный агар + стерильное молоко + эритромицин 10 мкг/мл).

Культивирование клеток рекомбинантного штамма *B. subtilis* JB 20-36, проводили на среде LB следующего состава (%): триптон (Диа-М, Россия) – 1.0; дрожжевой экстракт (Диа-М) – 0.5; NaCl – 0.5; pH 7.7 и стерилизовали при 1 атм. Перед посевом в среду добавляли стерильный раствор эритромицина в концентрации 10 мкг/мл, так как плазида несет ген устойчивости к данному антибиотику. Рекомбинантный штамм *B. subtilis* культивировали в колбах объемом 100 мл при соотношении объема среды к объему колбы 1 : 4 на вибростенде с интенсивностью качания 200 об./мин при 37 °С. Посевным материалом служила 24-часовая культура.

Раствор неорганического фосфата (Φ_{H}) стерилизовали отдельно при 1 атм и вносили в среду культивирования рекомбинантного штамма *B. subtilis* перед посевом в конечной концентрации 0.2–0.5 г/л. Растворы казеина по Гаммерстену (Serva, Германия), желатина (Sigma, США) и коллагена (ЗАО «Биопрогресс», Россия) стерилизовали при 0.5 атм и вносили в среду перед посевом в конечной концентрации 1.0% и 2.0%. Активность определяли на 24-й час роста. Контролем служили пробы без добавления белковых субстратов. Стерильный раствор глюкозы вносили в конечной концентрации 1.0% в опытные колбы на 0-й (перед началом культивирования) и 6-й часы роста, пробы отбирали на 24-й час роста культуры для определения количества биомассы и протеолитической активности. Контролем служила среда без добавления глюкозы.

Прирост биомассы определяли нефелометрически на КФК-2 при длине волны 590 нм. Количество биомассы выражали в единицах светопоглощения в кювете толщиной 1 см.

Протеолитическую активность определяли по гидролизу синтетического хромогенного субстрата Z-Glu-pNA (пара-нитроанилид карбобензоксиглутаминовой кислоты) [16]. За единицу активности принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 нМ субстрата за 1 мин.

Продуктивность культуры в отношении синтеза фермента (удельная активность) определяли как отношение величины протеолитической активности в культуральной жидкости к единице биомассы и выражали в условных единицах или процентах. Удельную скорость роста (μ) и удельную скорость прироста активности фермента (ϵ) рассчитывали по формулам: $\mu = d(\ln D)/dt$ и $\epsilon = d(\ln A)/dt$ соответственно.

При изучении спорообразования в качестве инокулята использовали 50-часовую культуру. Для получения синхронной культуры инокулят подвергали кратковременному прогреву при 80 °С в течение 30 с, кратность прогрева составила 5–6 раз. Для подсчета свободных спор клетки окрашивали по методу [17]. Количество свободных спор выражали в процентах по отношению к общему количеству вегетативных и спорулирующих клеток (100%), подсчет которых проводили в режиме фазово-контрастной микроскопии (микроскоп Carl Zeiss Jena) при увеличении в 1600 раз в 5 полях зрения, как описано ранее [8]. Стадии споруляции определяли по схеме описанной Шлегелем [18, с. 76–79].

При исследовании влияния pH питательной среды на биосинтез фермента использовали среды с pH, равными 8.5, 8.0, 7.7, 7.3. Протеолитическую активность, полученную на среде с pH 8.5, принимали за 100%.

При изучении степени влияния аэрации на биосинтез фермента использовали следующие соотношения объема среды к объему колбы: 1 : 4, 1 : 5, 1 : 7, 1 : 10. Активность фермента определяли, как описано выше.

Для анализа экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel для расчета среднеквадратичного отклонения (σ). Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении $\sigma \leq 15\%$. При расчете достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая $P \leq 0.05$ за достоверный уровень значимости. При постановке двухфакторных экспериментов обработку результатов проводили с помощью комплекса компьютерных программ BIOPT [19].

2. Результаты и их обсуждение

После трансформации плазмиды с модифицированным геном глутамилэндопептидазы *B. intermedius* 3-19 в штамм *B. subtilis* JB 20-36, дефектный по собственным внеклеточным протеиназам, на идентификационной среде выявлено 16 клонов трансформантов. Зоны лизиса свидетельствовали о наличии у трансформантов протеолитической активности, тогда как бесплазмидные штаммы зон лизиса не давали. Были отобраны 4 трансформированных клон с выраженными зонами лизиса. Определение протеолитической активности трансформантов на хромогенных субстратах позволило выявить клон с максимальной активностью и продуктивностью, который был использован в дальнейшей работе.

Исследовали динамику роста культуры, синтеза глутамилэндопептидазы и спорообразования рекомбинантным штаммом *B. subtilis* (рис. 1). Глутамилэндопептидаза появляется в культуральной жидкости в фазе замедления роста культуры на 10–12-й час роста и достигает максимума в стационарной фазе. Нами обнаружены максимумы активности против специфического субстрата Z-Glu-pNA на 24-й час, второй максимум – на 48-й час роста и небольшое повышение уровня активности на 72-й час роста культуры. Удельная скорость накопления фермента (ϵ) нарастает в период, когда удельная скорость роста (μ) падает, что характерно для катаболических ферментов, синтез которых представляет собой двухфазный процесс [20]. Следует отметить, что первый максимум активности фермента сдвинут в сторону поздней стационарной фазы роста по сравнению с исходным штаммом *B. intermedius* 3-19 (18-й час роста) [6, 14].

При изучении спорообразования у рекомбинантного штамма *B. subtilis* установлено, что единичные свободные споры появляются на 30–32-й час роста и достигают 25% лишь к 48-му часу роста. Это позволяет сделать заключение, что глутамилэндопептидаза второй белковой фракции («поздний» фермент) является секретлируемым белком. К 72-му часу роста количество свободных спор достигает 75–80%, что свидетельствует о возможности появления третьей белковой фракции, вероятно, за счет лизиса клеток. Следует отметить, что продукция глутамилэндопептидазы на поздней стационарной фазе роста обнаружена нами также у бактерий *B. amylaliquefaciens* H2 [21]. По-видимому, экспрессия этих сериновых протеиназ связана с физиологическим состоянием культуры.

Мы исследовали закономерности образования глутамилэндопептидазы рекомбинантного штамма, соответствующей 24-му часу роста культуры (ранний фермент).

Рекомбинантные штаммы для культивирования нуждаются в обогащенных питательных средах с высоким содержанием азота и фосфора. Мы разрабатывали среду для культивирования рекомбинантного штамма с модифицированным геном *gse Vi* на основе среды LB, содержащей высокоочищенный триптон. Для активной продукции чужеродного белка рекомбинантным штаммом особое значение имеет питательная среда, обогащенная органическими и неорганическими источниками азота, а также фосфором и ионами двухвалентных металлов. Для стимуляции синтеза глутамилэндопептидазы рекомбинантным штаммом *B. subtilis* добавляли в среду сложные белковые субстраты, используемые бактериями как дополнительный источник азота: казеин, желатин, коллаген (аналог пептона животного происхождения) в концентрациях 1% и 2%. Результаты представлены на рис. 2.

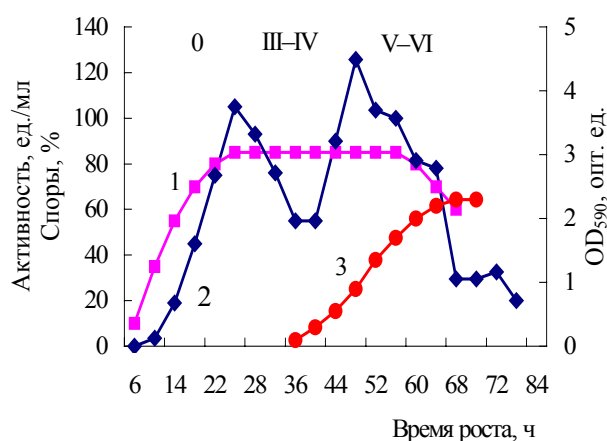


Рис. 1. Динамика роста, биосинтеза глутамилэндопептидазы и спорообразования рекомбинантным штаммом *B. subtilis*: 1 – рост культуры, OD₅₉₀; 2 – активность фермента, ед./мл; 3 – количество свободных спор, %

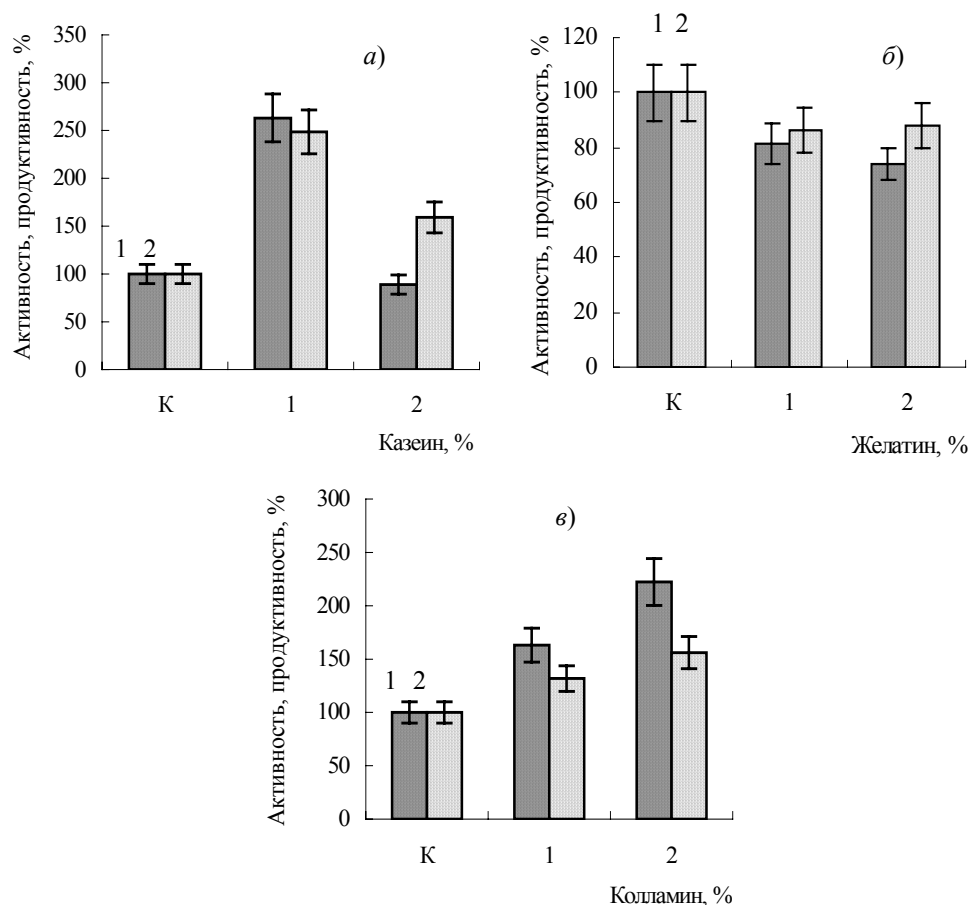


Рис. 2. Влияние белковых субстратов на активность глутамилэндопептидазы и продуктивность рекомбинантного штамма *B. subtilis*: а – казеин, б – желатин, в – коллагин; 1 – активность фермента, 2 – продуктивность культуры. За 100% (К – контроль) приняты значения на среде, не содержащей белковые субстраты

Табл. 1

Оптимизация состава питательной среды для максимального накопления глутамилэндопептидазы, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis* на 24-й час роста культуры

Уровни факторов				Биомасса, опт. ед.	Активность, нМ/мл	Продуктивность, усл. ед.
Казеин		Na ₂ HPO ₄				
X ₁	г/л	X ₂	г/л			
+	15	+	0.6	5.1	12.7	2.49
-	5	+	0.6	5.2	13.0	2.5
+	15	-	0.4	5.2	13.5	2.59
-	5	-	0.4	5.0	12.2	2.44
+	15	0	0.5	5.8	17.9	3.08
-	5	0	0.5	5.4	18.3	3.38
0	10	+	0.6	5.6	15.3	2.73
0	10	-	0.4	5.5	14.2	2.58
0	10	0	0.5	5.9	18.5	3.15

Рост бактерий при внесении в среду казеина (1–2%) практически не изменялся, но активность фермента и продуктивность культуры увеличивались до 260% и 240% соответственно (рис. 2, а).

Желатин в концентрации 1% и 2% незначительно ингибировал рост культуры и снижал активность фермента на 20–25% и продуктивность культуры на 13–15% (рис. 2, б). При внесении в среду коллагена незначительно увеличивалась скорость роста клеток. Активность фермента и продуктивность культуры увеличивались до 220% и 160% соответственно (рис. 2, в).

Таким образом, казеин как дополнительный источник органического азота является предпочтительнее желатина и коллагена. Эти данные коррелируют с результатами, полученными для рекомбинантных штаммов *B. subtilis* AJ73 pV и Δ58.21 [5, 12], где было показано, что казеин и желатин в концентрации 1% увеличивают продуктивность на 50–100% и 40–50% соответственно. В то же время эти субстраты не оказывали положительного влияния на биосинтез глутамилэндопептидазы исходным штаммом *B. intermedius* 3-19 [6].

Исследовали взаимное влияние органического фосфата и казеина, внесенных в питательную среду как дополнительные источники фосфора и азота, на биосинтез глутамилэндопептидазы рекомбинантным штаммом *B. subtilis*. Для этого проводили двухфакторный эксперимент, в котором казеин (X₁) и неорганический фосфат (X₂) варьировали на трех уровнях. Уровни указанных факторов и усредненные по трем повторностям значения биомассы (оптической плотности), активности и продуктивности культуры в отношении синтеза глутамилэндопептидазы приведены в табл. 1.

Результаты двухфакторных экспериментов представлены на рис. 3 и 4, где выделены зоны, оптимальные по двум рассматриваемым факторам. Из полученных данных следует, что для максимальной продукции глутамилэндопептидазы в питательную среду следует добавлять казеина 10.25 г/л и неорганического фосфата 0.5 г/л.

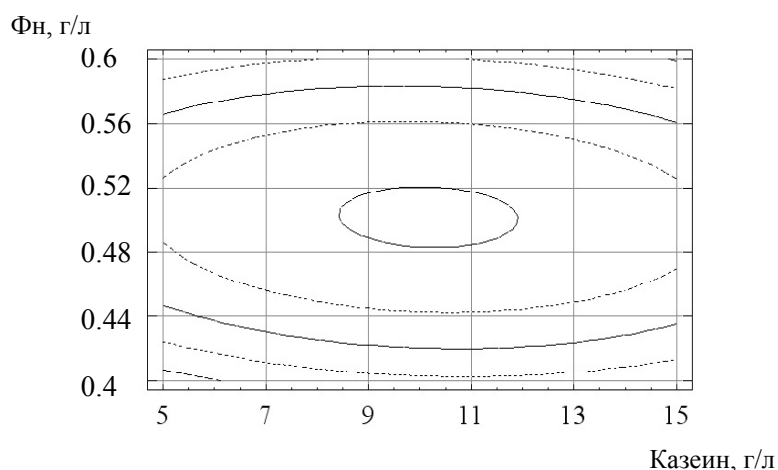


Рис. 3. Линии уровня активности глутамилэндопептидазы в зависимости от содержания казеина и неорганического фосфата в среде. За единицу активности принята максимальная активность фермента в эксперименте

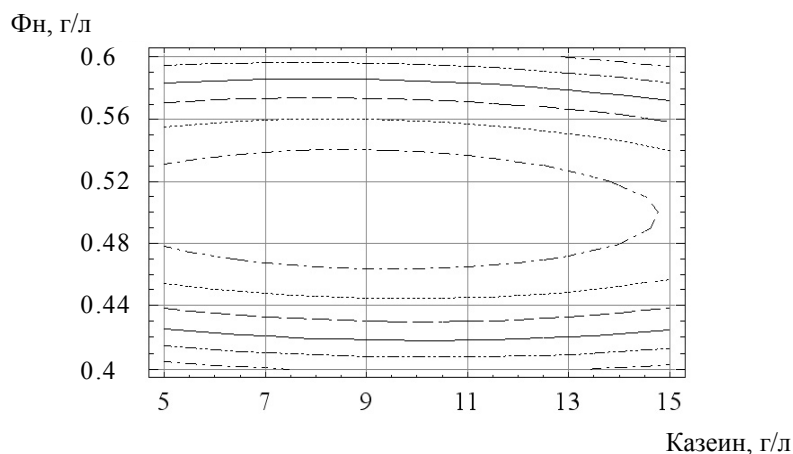


Рис. 4. Линии уровня продуктивности глутамилэндопептидазы в зависимости от содержания казеина и неорганического фосфата в среде

Из литературы известно, что неорганический азот стимулирует синтез глутамилэндопептидаз [22]. Выясняли влияние ионов аммония, внесенных в оптимизированную питательную среду в качестве дополнительного источника азота, на биосинтез глутамилэндопептидазы рекомбинантным штаммом *B. subtilis* 20-36. Из рис. 5 видно, что присутствие в среде ионов аммония в концентрации 5 мМ стимулирует продукцию фермента на 20% по сравнению с контролем. Дальнейшее увеличение концентрации ионов аммония не повышает продуктивности культуры. Эти результаты согласуются с данными, полученными для глутамилэндопептидаз исходного штамма *B. intermedius* 3-19 и рекомбинантного штамма *B. subtilis* AJ73 pV, для которых была показана стимуляция синтеза фермента на 15% и 20% соответственно [5, 6], в то время как на синтез глутамилэндопептидазы рекомбинантного штамма *B. subtilis* AJ73 Δ58.21 ионы аммония не оказывают положительного влияния [12].

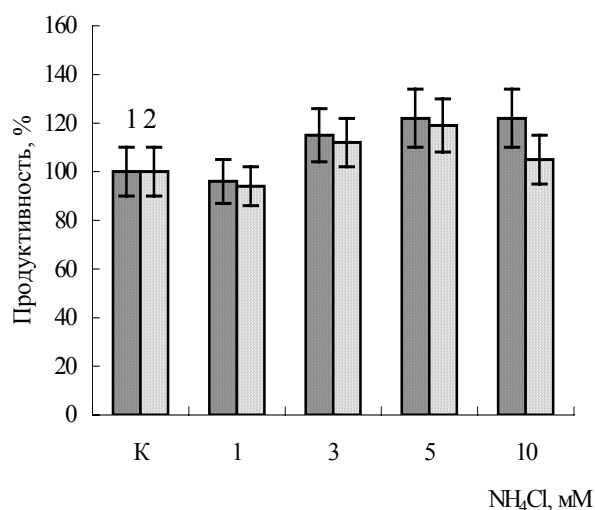


Рис. 5. Влияние NH_4Cl на биосинтез глутамилэндопептидазы рекомбинантного штамма *B. subtilis*: 1 – активность фермента в культуральной жидкости; 2 – продуктивность культуры; К – контрольная среда, без NH_4Cl (100%)

Таким образом, присутствие в среде дополнительного источника неорганического азота оказывает положительный эффект на продуктивность фермента рекомбинантным штаммом *B. subtilis* JB 20-36.

На биосинтез протеолитических ферментов оказывают влияние не только компоненты питательной среды, но и условия культивирования продуцента, а именно: величина pH питательной среды, температура, аэрация, количество и возраст посевного материала. Изучение влияния этих факторов на биосинтез протеиназ позволяет определить оптимальные условия культивирования бактериальных клеток с целью получения максимальной продукции фермента. Исследовали влияние различных значений pH среды (8.5, 8.0, 7.7, 7.3) на продукцию глутамилэндопептидазы рекомбинантным штаммом *B. subtilis*. В качестве контроля была взята среда с pH 8.5. Величина pH 8.5 питательной среды традиционно используется для биосинтеза многих гидролитических ферментов, в том числе и протеиназ *B. intermedius* 3-19 и рекомбинантного штамма *B. subtilis* AJ73. Результаты этого эксперимента представлены на рис. 6. Рост культуры практически не изменяется на средах с pH 7.7–8.5. Активность фермента и продуктивность культуры на среде с pH 7.7 выше в 3.5 и 5 раз соответственно, чем на среде с pH 8.5.

Рост и метаболизм аэробных бактерий зависят от концентрации кислорода в среде культивирования. На рис. 7 показаны результаты исследования влияния интенсивности аэрации на уровень продукции глутамилэндопептидазы рекомбинантным штаммом *B. subtilis*. Как видно из рисунка, с увеличением степени аэрации увеличивается рост культуры и достигает 140% при соотношении объема среды к объему колбы 1 : 10. Активность фермента с увеличением степени аэрации уменьшается незначительно, однако продуктивность культуры в отношении биосинтеза глутамилэндопептидазы достигает максимума при соотношении объема среды к объему колбы 1 : 4.

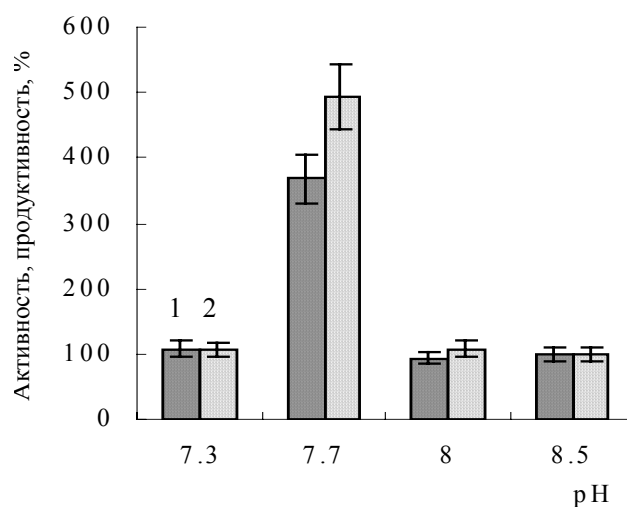


Рис. 6. Влияние pH на активность глутамилэндопептидазы и продуктивность рекомбинантного штамма *B. subtilis*. За 100% приняты значения на среде с pH 8.5: 1 – активность, %; 2 – продуктивность, %

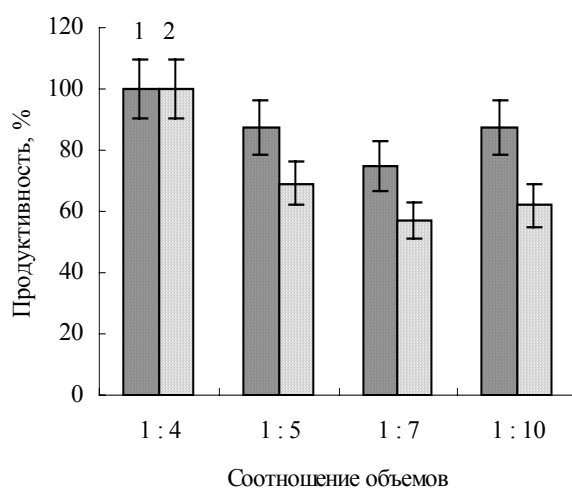


Рис. 7. Влияние аэрации на биосинтез глутамилэндопептидазы рекомбинантного штамма *B. subtilis*: 1 – активность; 2 – продуктивность. За 100% приняты результаты, полученные при соотношении объема среды к объему колбы 1 : 4

Заключение

Таким образом, нами разработана питательная среда для продукции глутамилэндопептидазы, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis* JB 20-36, следующего состава (%): триптон – 1.0; дрожевой экстракт – 0.5; NaCl – 0.5; Φ_{H} – 0.05; казеин – 1.25; NH_4Cl – 0.27. Соотношение объема среды к объему колбы составляет 1 : 4, pH питательной среды равен 7.7.

Авторы выражают признательность профессору С.В. Кострову и кандидату биологических наук, старшему научному сотруднику И.В. Демидюку за предоставление модифицированного штамма *gse Vi* для работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ФЦП П 1053).

Summary

Yu.V. Danilova, N.P. Balaban, T.R. Shamsutdinov, A.M. Mardanova, M.R. Sharipova. Cultivation Milieu for Recombinant Strain *Bacillus subtilis* with Modified Gene of Glutamyl Endopeptidase of *Bacillus intermedius*.

It is known that proteinase biosynthesis is influenced by the conditions of a producer's cultivation. We show that enzyme production is 5 times higher on the medium with pH 7.7 than on the medium with pH 8.5 traditionally used for biosynthesis of many hydrolytic enzymes, including proteinases of initial strain of *B. intermedius* 3-19 and recombinant strains of *B. subtilis* AJ73. Maximum efficiency of recombinant strain in terms of the synthesis of glutamyl endopeptidase is observed with a medium volume to flask volume ratio of 1 : 4.

Key words: *B. subtilis*, *B. intermedius*, recombinant strain, biosynthesis, glutamyl endopeptidase.

Литература

1. *Drapeau G.R., Bioly Y., Houmard J.* Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus* // *J. Biol. Chem.* – 1972. – V. 247, No 20. – P. 6720–6726.
2. *Руденская Г.Н.* Глутамилэндопептидазы микроорганизмов – новое подсемейство химотрипсिनových протеиназ // *Биорган. химия.* – 1998. – Т. 24, № 4. – С. 256–261.
3. *Leshchinskaya I.B., Shakirov E.V., Itskovich E.L., Balaban N.P., Mardanova A.M., Sharipova M.R., Viryasov M.B., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M.* Glutamyl endopeptidase of *Bacillus intermedius*, strain 3-19 // *FEBS Lett.* – 1997. – V. 404, No 2. – P. 241–244.
4. *Балабан Н.П., Марданова А.М., Шарипова М.Р., Габдрахманова Л.А., Соколова Е.А., Гарусов А.В., Мильготина Е.И., Руденская Г.Н., Лецинская И.Б.* Получение и характеристика глутамилэндопептидазы 2 *Bacillus intermedius* 3-19 // *Биохимия.* – 2003. – Т. 68, № 11. – С. 1514–1521.
5. *Габдрахманова Л.А., Шакиров Е.В., Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Руденская Г.Н., Костров С.В., Акимкина Т.В., Лецинская И.Б.* Среда для биосинтеза глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* // *Микробиол.* – 2000. – Т. 69, № 5. – С. 653–659.
6. *Шакиров Е.В., Габдрахманова Л.А., Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Руденская Г.Н., Лецинская И.Б.* Влияние компонентов питательной среды на накопление глутамилэндопептидазы в культуральной жидкости *Bacillus intermedius* 3-19 // *Микробиол.* – 2000. – Т. 69, № 1. – С. 29–33.
7. *Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Габдрахманова Л.А., Марданова А.М., Токмакова Ю.С., Соколова Е.А., Руденская Г.Н., Лецинская И.Б.* Синтез и секреция протеиназ *Bacillus intermedius* 3-19 на поздних стадиях спорообразования // *Микробиол.* – 2003. – Т. 72, № 3. – С. 338–342.
8. *Balaban N.P., Gabdrakhmanova L.A., Sharipova M.R., Sokolova E.A., Malikova L.A., Leshchinskaya I.B.* Selection of cultivation medium for production of late phase serine proteinases from *Bacillus intermedius* // *J. Basic Microbiol.* – 2004. – V. 44, No 6. – P. 415–423.

9. *Rebrikov D.V., Akimkina T.V., Shevelev A.V., Demiduyk I.V., Bushueva A.M., Kostrov S.V., Chestukhina G.G., Stepanov V.M.* *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase. Molecular cloning and nucleotide sequence of the structural gene // *J. Prot. Chem.* – 1999. – V. 18, No 1. – P. 21–27.
10. *Meijers R., Blagova E.V., Levdikov V.M., Rudenskaya G.N., Chestukhina G.G., Akimkina T.V., Kostrov S.V., Lamzin V.S., Kusanova I.P.* The crystal structure of glutamylendopeptidase from *Bacillus intermedius* reveals a structural link charge compensation // *Biochemistry.* – 2004. – V. 43, No 10. – P. 2784–2791.
11. *Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Габдрахманова Л.А., Шилова М.А., Кадырова Ю.М., Руденская Г.Н., Лецинская И.Б.* Гидролитические ферменты и спорообразование у *Bacillus intermedius* // *Микробиол.* – 2002. – Т. 71, № 4. – С. 494–499.
12. *Gabdrakhmanova L.A., Balaban N.P., Sharipova M.R., Kostrov S.V., Akimkina T.V., Rudenskaya G.N., Leshchinskaya I.B.* Optimization of *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase production by recombinant strain of *Bacillus subtilis* and localization of glutamyl endopeptidase in *Bacillus subtilis* cells // *Enzyme Microbial Technol.* – 2002. – V. 31, No 3. – P. 256–263.
13. *Частухина И.Б., Шарипова М.Р., Габдрахманова Л.А., Балабан Н.П., Сафина Д.Р., Костров С.В., Руденская Г.Н., Лецинская И.Б.* Регуляция биосинтеза внеклеточной глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* в рекомбинантном штамме *Bacillus subtilis* на стадии спорообразования // *Микробиол.* – 2004. – Т. 73, № 3 – С. 335–342.
14. *Частухина И.Б., Шарипова М.Р., Габдрахманова Л.А., Балабан Н.П., Костров С.В., Руденская Г.Н., Лецинская И.Б.* Особенности биосинтеза глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* рекомбинантными клетками *Bacillus subtilis* в стационарной фазе роста // *Микробиол.* – 2005. – Т. 74, № 1. – С. 39–47.
15. *Anagnostopoulos C., Spizizen J.* Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* – 1961. – V. 81, No 5. – P. 741–746.
16. *Мосолова О.В., Руденская Г.Н., Степанов В.М., Ходова О.М., Цапина И.А.* Glu, Asp-специфичная протеиназа актиномицетов // *Биохимия.* – 1987. – Т. 52, № 3. – С. 414–422.
17. *Егоров С.Н.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. – 221 с.
18. *Шлегель Г.* Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 366 с.
19. *Краснов С.В., Знаменская Л.В.* Комплекс программ ВЮРТ для оптимизации в биологических исследованиях // *Биол. науки.* – 1992. – № 2. – С. 15–18.
20. *Coleman G., Brown S., Stormonth D.A.*, A model for the regulation of bacterial extracellular enzyme and toxin biosynthesis // *J. Theor. Biol.* – 1975. – V. 52, No 1. – P. 143–148.
21. *Маликова Л.А., Балабан Н.П., Габдрахманова Л.А., Марданова А.М., Шарипова М.Р.* Питательная среда для эффективной продукции глутамилэндопептидаз, секретруемых в стационарной фазе роста *Bacillus amiloliquefaciens H2* // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки.* – 2007. – Т. 149, кн. 1. – С. 102–112.
22. *Gabdrakhmanova L.A., Shakirov E.V., Balaban N.P., Sharipova M.R., Rudenskaya G.N., Leshchinskaya I.B.*, Biosynthesis and localization of glutamylendopeptidase of *Bacillus intermedius* 3-19 // *Microbios.* – 1999. – V. 100, No 396. – P. 97–108.

Поступила в редакцию
07.02.11

Данилова Юлия Васильевна – студент кафедры микробиологии Казанского (При-
волжского) федерального университета.
E-mail: Danilova146@mail.ru

Балабан Нелли Павловна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *NellyBalaban@ksu.ru*

Шамсутдинов Талгат Рахимзянович – кандидат биологических наук кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *Talgat_saby@mail.ru*

Марданова Айслу Миркасымовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *Ayslu.Mardanova@ksu.ru*

Шарипова Маргарита Рашидовна – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *Margarita.Sharipova@ksu.ru*