

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки: 06.03.01– Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ СЕКРЕТИРУЕМЫХ ПРОТЕИНАЗ
БАЦИЛЛ В СОСТАВЕ LIKE-СИСТЕМЫ.

Работа завершена:

"__" _____ 20__ г. _____ (А.В. Солодка)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель
д.б.н., профессор

"__" _____ 20__ г. _____ (М.Р. Шарипова)

Заведующий кафедрой
д.б.н., профессор

"__" _____ 20__ г. _____ (О.Н. Ильинская)

Казань-2020

ВВЕДЕНИЕ

Протеазы, или протеолитические ферменты — термин для обозначения ферментов, разлагающих белки путем гидролиза пептидных связей. Протеиназы встречаются у животных, растений и микроорганизмов. В связи с высокой скоростью синтеза целевых веществ, простотой культивирования и безопасностью в работе в качестве источника протеаз активно используются разнообразные штаммы микроорганизмов. Причем, представители рода *Bacillus* являются наиболее важными из распространенных продуцентов протеиназ, что связано с высоким уровнем секреции белка у этих микроорганизмов. По статистическим данным протеазы представителей рода *Bacillus* составляют до 60% от общего количества продаж ферментов в мире, что свидетельствует о широкой сфере применения этих ферментов в промышленности и биотехнологии. В последнее время повысился интерес к классу сериновых протеиназ, среди которых представителями рода *Bacillus* преимущественно синтезируются субтилизиноподобные протеиназы. Такие ферменты используются, например, в роли биокатализаторов синтеза пептидных связей, обладая широкой субстратной специфичностью, стабильностью при высоких значениях pH, активностью в широком интервале температур, устойчивостью к хелатирующим и окисляющим агентам, идеально подходят для использования в составе детергентов. Для промышленного получения протеиназ чаще всего используют экспрессионные системы. В настоящей работе мы использовали оптимизированную LIKE-систему экспрессии, сконструированная на основе индуцируемого стрессом промотора *liaIH*-оперона *B. subtilis* и рекомбинантных сигнальных пептидов *B. megaterium*.

Целью работы являлся анализ экспрессии сериновых протеиназ *B. pumilus* в составе рекомбинантных штаммов *B. subtilis* на основе LIKE экспрессионной системы экспрессии.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие задачи:

- 1) Провести трансформацию рекомбинантных конструкций на основе различных сигнальных пептидов в протеазодефицитный штамм *B. subtilis* 20-36;
- 2) Изучить динамику роста и активности рекомбинантных штаммов *Bacillus subtilis* 20-36
- 3) Провести сравнительный анализ экспрессии сериновых протеиназ *B. pumilus* под контролем индуцибельного и конститутивного промоторов *B. subtilis*.

ВЫВОДЫ

- 1) Получены трансформанты штаммов *B. subtilis* 20-36 с рекомбинантными плазмидами: MRB 081 (pLIKEint- P_{liaI} +*aprBp*); 3,4 – *B. subtilis* MRB082 (pLIKEint- P_{liaI} + SP_{Pac} +*aprBp*); 5,6 – *B. subtilis* MRB083 (pLIKEint- P_{liaI} + SP_{Yngk} +*aprBp*); 7,8 – *B. subtilis* MRB084 (pLIKEint- P_{liaI} + SP_{Asp} +*aprBp*);
- 2) Установлено, что замена собственного сигнального пептида гена субтилизиноподобной протеиназы (SP_{AprBp}) на рекомбинантный сигнальный пептид SP_{Asp} привела к увеличению активности фермента в ~3 раза;
- 3) Показано, что экспрессия субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* в протеазодефицитном штамме *B. subtilis* 20-36 под контролем индуцибельного промотора P_{LiaI} , в составе оптимизированной LIKE-системы в 4 раза эффективнее, чем в штаммах *B. subtilis* 20-36 под контролем конститутивного P_{degQ36} промотора.