

УДК 579.22:579.852.11

**ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ  
СУБТИЛИЗИНОПОДОБНЫХ ПРОТЕИНАЗ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ  
*BACILLUS PUMILUS* KMM 62**

*Л.А. Маликова, А.М. Марданова, О.В. Соколова,  
Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова*

**Аннотация**

Поиск новых бактериальных продуцентов и путей увеличения выхода протеиназ остается актуальной проблемой современной микробиологии и биотехнологии. В настоящей работе изучена динамика роста *Bacillus pumilus* KMM 62 и биосинтеза субтилизиноподобной протеиназы. Исследовано влияние ряда факторов среды культивирования на рост и эффективность продукции субтилизиноподобной протеиназы. Подобран состав питательной среды, оптимальный для синтеза фермента. Показана нецелесообразность замены пептона на коллаген и глюкозу. Исследовано влияние белков и индивидуальных аминокислот на продукцию фермента. Показано, что синтез внеклеточной субтилизиноподобной протеиназы может регулироваться посредством азотной катаболитной репрессии.

**Введение**

Высокая скорость роста, возможность культивирования на дешевом непищевом сырье и применения генно-инженерных подходов делают микроорганизмы перспективными источниками практически ценных ферментных препаратов, в том числе и протеиназ. Среди этой группы гидролаз наиболее широко используемыми в практике являются сериновые протеиназы. Они применяются в промышленности, биотехнологии, научных исследованиях [1]. Обнаружение протеиназ с фибринолитическими и коагулазными свойствами и получение моноклональных антител с протеолитической активностью определяют перспективы использования этих гидролаз и в медицине [2, 3]. Поиск новых перспективных продуцентов и путей увеличения выхода протеиназ остается актуальной проблемой современной микробиологии. Известно, что микроорганизмы имеют гибкие механизмы регуляции метаболизма, которые позволяют им быстро адаптироваться к меняющимся условиям окружающей среды. Одной из реакций адаптации бактерий является синтез внеклеточных ферментов, что, в свою очередь, в значительной степени определяется составом питательной среды и условиями культивирования.

**1. Постановка задачи**

Культура *Bacillus pumilus* является продуцентом внеклеточной сериновой протеиназы. Ген сериновой субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus*

клонирован и его последовательность секвенирована [4]. Однако в литературе мало данных о закономерностях биосинтеза этого фермента, о влиянии различных экзогенных факторов на экспрессию гена этого белка. Подбор оптимальных условий культивирования для получения максимального выхода субтилизиноподобных протеиназ *Bacillus pumilus* является начальным этапом работы по выяснению механизмов биосинтеза и последующего препаративного получения этих ферментов.

Целью работы является подбор состава питательной среды для повышения уровня синтеза субтилизиноподобных протеиназ *B. pumilus* и определения возможностей влияния различных экзогенных факторов на уровень накопления этих ферментов в культуральной жидкости.

## 2. Материалы и методы

**2.1. Объект исследования.** Объектом исследования служил штамм *B. pumilus* КММ 62, выделенный из морской воды (из коллекции кафедры микробиологии Казанского государственного университета).

**2.2. Питательные среды.** С целью подбора оптимальной среды для биосинтеза внеклеточных протеиназ культурой *B. pumilus* использовали следующие питательные среды:

**Среда № 1.** В качестве основы использовали синтетическую среду следующего состава, (г/л):  $\text{NaHPO}_4$  – 0.3 или 0.5,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.1,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.3,  $\text{NaCl}$  – 3.0,  $\text{MnSO}_4$  – 0.1, pH 9.0. К солевой основе добавляли пептон в конечной концентрации 5, 10, 20, 30 и 50 г/л, pH 9.0.

**Среда № 2.** В качестве основы использовали ту же синтетическую среду как и в случае среды № 1. Однако вместо пептона добавляли коллаген в концентрациях 20 или 30 г/л, pH 9.0.

**Среда № 3.** В качестве основы использовали синтетическую среду следующего состава, (г/л):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 0.7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2.5,  $\text{MgSO}_4$  – 0.5,  $\text{NaCl}$  – 5. К солевой основе добавляли глюкозу в конечной концентрации 0.0, 0.1 и 1%, pH 9.0.

**Среда № 4 (среда Лурия – Бертони).** Триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л,  $\text{NaCl}$  – 5 г/л, pH 9.0.

Все среды стерилизовали при 1 атм. Раствор неорганического фосфата стерилизовали отдельно при 1 атм и вносили в среду перед посевом в конечной концентрации 0.3 и 0.5 г/л. Растворы казеина, желатина, дрожжевого экстракта (“Difco”, США), овсяной и соевой муки, глюкозы стерилизовали при 0.5 атм и вносили в среду в конечной концентрации 0.1, 0.5 и 1.0%.

**2.3. Условия культивирования клеток.** Соотношение объема колбы к объему среды бралось 1:5. Посевным материалом служила 12–15-часовая культура (1% v/v). Культивирование проводили при температуре 37°C на вибростенде, 200 об./мин.

**2.4. Идентификация и подсчет спор.** При изучении спорообразования в качестве инокулята использовали 50-часовую культуру. Для получения син-

хронной культуры инокулят подвергали кратковременному прогреву при 80°C в течение 30 сек. 5–6 раз. Для подсчета свободных спор клетки окрашивали по Пешкову. Мазок фиксировали в пламени горелки, окрашивали метиленовой синью (по Леффлеру) с подогреванием до кипения, затем смывали водой и докрашивали 5%-ным водным раствором нейтрального красного в течение 30 сек., смывали водой и высушивали фильтровальной бумагой. Споры при этом окрашивались в синий цвет, а вегетативные клетки – в ярко-розовый. 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 5–10 полях зрения.

**2.5. Определение роста культуры.** Контроль за ростом культуры осуществляли, определяя изменение оптической плотности ( $D_{\text{опт}}$ ) культуры. Прирост биомассы определяли нефелометрически на ФЭК-56 ПМ со светофильтром 9 при длине волны 590 нм. За единицу биомассы принимали поглощение в 1 см кювете.

**2.6. Определение активности фермента.** Протеолитическую активность определяли по гидролизу синтетического хромогенного субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNA, как описано в работе Люблинской с соавторами [5]. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующего в условиях эксперимента 1 мкмоль субстрата за 1 мин.

Продуктивность культуры определяли как отношение величины ферментативной активности в культуральной жидкости к оптической плотности и выражали в условных единицах или процентах от величины продуктивности культуры на контрольной среде.

Удельную скорость роста бактериальной культуры  $\mu$  определяли по формуле  $\mu = \frac{d}{dt} \cdot \ln D$ , где  $D$  – оптическая плотность культуры.

Удельную скорость синтеза субтилизиноподобной протеиназы  $\varepsilon$  подсчитывали по формуле  $\varepsilon = \frac{d}{dt} \cdot \ln A$ , где  $A$  – активность фермента.

### 3. Результаты и обсуждение

**3.1. Динамика роста, биосинтеза субтилизиноподобных протеиназ и спорообразования *Bacillus pumilus*.** Изучение динамики роста культуры *Bacillus pumilus* показало, что эта культура менее интенсивно растет, и начало стационарной фазы роста приходится на более поздние часы по сравнению с *Bacillus intermedius* (30 и 16 ч соответственно) [6, 7]. Максимальная скорость роста ( $0.28 \text{ ч}^{-1}$ ) наблюдается в период от 10-го до 16-го ч культивирования.

В культуральной жидкости *B. pumilus* нами идентифицирована протеиназа, гидролизующая синтетический субстрат Z-Ala-Ala-Leu-pNa, специфический для субтилизинов. Была исследована динамика накопления этого фермента в процессе культивирования. Фермент обнаруживается в культуральной жидкости на 20 ч, после чего уровень его активности повышается, достигая двух мак-

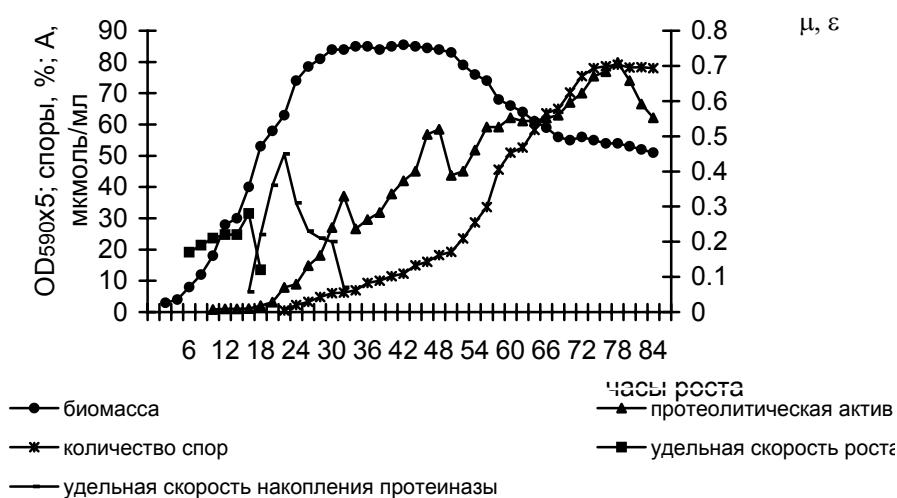


Рис. 1. Динамика роста, биосинтеза субтилизиноподобной протеиназы и спорообразования *B. pumilus* KMM 62

симумов, соответствующих 32 и 46–48 ч роста культуры (рис. 1). Наибольшая скорость продукции субтилизиноподобной протеиназы имеет место к 20–26 ч роста. Фермент, соответствующий первому максимуму (32 ч) обозначили как субтилизиноподобная протеиназа 1, фермент, соответствующий второму максимуму (46–48 ч) – субтилизиноподобная протеиназа 2. Полученные результаты близки к ранее опубликованным данным по биосинтезу субтилизиноподобных протеиназ у *Bacillus intermedius* и *Bacillus amyloliquefaciens*. В процессе культивирования этих бактерий также наблюдали два максимума накопления специфической ферментативной активности в культуральной жидкости, соответствующие 24–26 и 44–46 ч роста [7]. Однако первый максимум накопления активности у *B. intermedius* и *B. amyloliquefaciens* приходится на более ранние часы по сравнению с *B. pumilus* – 24–26 и 32 ч роста соответственно. Первый максимум накопления протеолитической активности у *B. pumilus* совпадает с началом стационарной фазы роста, а интенсивный синтез фермента происходит при замедлении роста культуры. Между максимальной скоростью роста культуры и наибольшей скоростью накопления субтилизиноподобной протеиназы 1-го пика временной интервал составляет 10–12 ч. Таким образом, синтез субтилизиноподобной протеиназы 1-го пика *B. pumilus* начинается при замедлении роста культуры, что характерно и для других видов бацилл. Наиболее интенсивно фермент синтезируется при переходе культуры в стационарную фазу.

Поскольку второй максимум накопления внеклеточной протеиназы приходится на стационарную фазу роста, возникает вопрос о природе накопления этого белка в культуральной жидкости: является ли фермент секретлируемым или он накапливается в среде в результате лизиса клеток. Как видно из результатов исследования динамики спорообразования (рис. 1), на 46–48 ч роста число свободных спор невелико (не более 15%) и поэтому невозможно объяснить лизисом клеток такое значительное увеличение внеклеточной протеолитической активности (уровень активности во 2-м пике примерно в 2 раза выше, чем

в 1-м). Это свидетельствует о том, что субтилизиноподобная протеиназа представляет собой секретлируемый фермент и не накапливается в среде в результате лизиса. Однако после 54–55 ч роста наблюдается еще один подъем уровня внеклеточной протеолитической активности, что коррелирует с появлением большого количества свободных спор. Повышение внеклеточной субтилизиноподобной активности, наблюдаемое после 55–60 ч роста культуры, видимо, связано с выходом протеиназ при массовом лизисе клеток (количество спор достигает 70–80 %).

**3.2. Подбор питательной среды для биосинтеза субтилизиноподобных протеиназ *B. pumilus*.** Известно, что синтез внеклеточных ферментов очень сильно зависит от многих факторов и, в первую очередь, от состава питательной среды. Для определения оптимального состава среды нами были использованы четыре варианта различных питательных сред, в которых варьировали концентрации некоторых компонентов. Протеолитическую активность определяли в культуральной жидкости на 32 и 48 ч роста. Результаты представлены в табл. 1.

Из литературы известно, что высокое содержание в питательных средах органических соединений типа пептона приводит к более интенсивному росту и продукции внеклеточных щелочных протеиназ бактерий [8]. Полученные результаты совпадают с литературными данными. В среде № 1 в качестве источника углерода и азота использовали пептон, концентрация которого варьировалась от 5 до 50 г/л. Внесение пептона в низких концентрациях (5–10 г/л) приводит к значительному понижению выхода и биомассы, и фермента. Так, внеклеточная активность снижалась почти до нуля при уменьшении концентрации пептона в среде до 5 г/л. С другой стороны, значительное повышение содержания пептона в питательной среде (50 г/л) также приводило к падению продуктивности культуры. Оптимальным является содержание пептона в среде № 1, равное 30 г/л. В среде № 2 в качестве источника азота и углерода вместо пептона использовали коллаген в концентрациях 20 и 30 г/л. Как видно из табл. 1, замена пептона на коллаген оказалась нецелесообразной, поскольку это приводило к сильному снижению продукции внеклеточной протеиназы. Рост и продуктивность на среде № 3 сильно зависели от содержания глюкозы. На среде без глюкозы и с 0.1% глюкозы рост культуры сильно ингибировался, а активность субтилизиноподобной протеиназы отсутствовала. В присутствии 1% глюкозы отсутствовала активность на 32 ч культивирования, а активность на 48 ч роста составляла менее 50% от активности на среде № 1. Среда № 4 (LB) также оказалась менее эффективной для продукции протеиназы, особенно протеиназы пика 1 (32 ч роста).

Исходя из полученных результатов, для дальнейших исследований нами была выбрана питательная среда № 1 с пептоном в концентрации 30 г/л (исходная среда).

На следующем этапе работы определяли оптимальные условия культивирования – pH среды и уровень аэрации для получения высокого выхода протеиназ. Результаты исследования влияния pH среды на рост культуры и накопление протеолитической активности представлены на рис. 2. Культура *B. pumilus* хорошо растет в широком диапазоне pH среды. Оптическая плот-

Табл. 1

Рост и продуктивность культуры *B. pumilus* КММ 62 на различных средах

Среда №	Варианты питательных сред		Биомасса, опт. ед.		Активность, мкмоль/мл		Продуктивность, усл. ед.	
	Пептон, г/л	Фосфор неорг., г/л	32 ч	48 ч	32 ч	48 ч	32 ч	48 ч
Среда № 1	10	0.3	4.4	3.2	0.49	24.6	0.11	7.68
	10	0.5	5.16	4	0.49	71	0.09	17.7
	20	0.3	6.4	6	1.6	95	0.25	15.8
	20	0.5	8	6.8	4.9	83	0.6	12.2
	30	0.3	10.8	8	53.3	113.4	4.9	14
	30	0.5	12.8	10.8	53.3	103.5	4.2	9.6
	50	0.3	13.16	14.4	1.48	90	0.11	6.25
Среда № 2	Колламин, г/л							
	20		4.4	9.8	0.2	0.25	0.4	0.02
	30		4	9	0.22	0.33	0.49	0.03
Среда № 3	1% глюкозы		5	4.6	0	49	0	10.65
Среда № 4	LB		10.6	10	20.7	93.7	1.95	9.37

ность культуры на 32 и 48 ч роста мало зависит от pH в диапазоне 6–10. Небольшое повышение оптической плотности культуры на 32 ч роста наблюдалось при более щелочных значениях pH среды (9–10). На основании полученных данных можно отнести изучаемый штамм к группе алкалотолерантных бактерий. Однако, как видно из рисунка, pH среды оказывало влияние на накопление в культуральной жидкости субтилизиновой протеиназы, причем эта зависимость наблюдается только на поздней стадии роста (48 ч). Для накопления максимальной протеолитической активности оптимальными оказались pH среды от 9 до 9.5.

Для выяснения влияния аэрации на синтез фермента брали объем питательной среды к объему колбы в соотношениях 1:3, 1:5, 1:7. Оптимальный уровень аэрации для высокой продуктивности культуры наблюдался при соотношении объема среды к объему колбы, равном 1:5 и 1:7, то есть при повышенной аэрации. Полученные результаты были учтены при проведении дальнейших исследований.

**3.3. Влияние дополнительных источников азота на биосинтез субтизиноподобных протеиназ *B. pumilus*.** Как отмечалось выше, высокое содержание в питательных средах сложных органических соединений, например пептона и дрожжевого экстракта, приводит к более интенсивному росту бактерий и продукции внеклеточных протеиназ [9]. Это обусловлено тем, что сложные органические вещества лучше усваиваются и в них всегда присутствуют физиологически активные соединения, микроэлементы и другие факторы, благоприятно влияющие на рост и биосинтетическую активность микроорганизмов.

На следующем этапе работы исследовали влияние дрожжевого экстракта, овсяной и соевой муки в качестве дополнительного источника азота на биосин-

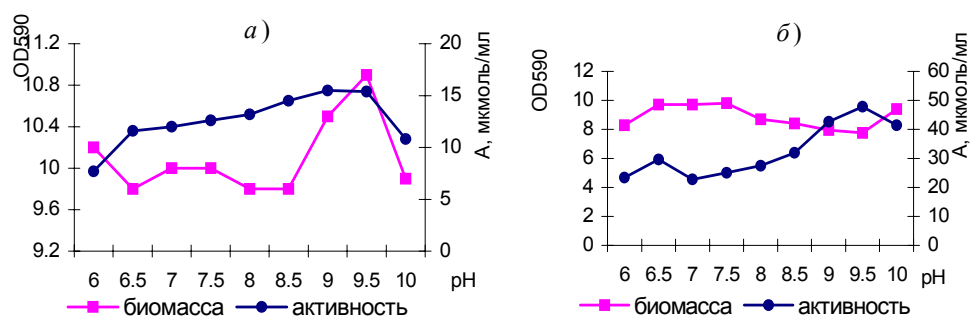


Рис. 2. Влияние pH среды на рост и накопление протеолитической активности в культуральной жидкости *B. pumilus*. а) 32 ч, б) 48 ч роста культуры

тез субтилизиноподобных протеиназ и рост культуры *B. pumilus* (рис. 3). С этой целью в исходную среду вносили эти добавки в разных концентрациях. В качестве контроля использовали активность на исходной среде без дополнительных добавок. Дрожжевой экстракт в концентрациях 0.1, 0.5, 1% практически не влиял на накопление биомассы в ранней стационарной фазе (32 ч), хотя в поздней стационарной фазе происходило уменьшение биомассы по сравнению с контролем на 30%. В то же время добавление дрожжевого экстракта приводило к интенсификации синтеза субтилизиноподобной протеиназы. Причем более эффективно дрожжевой экстракт стимулировал синтез субтилизиноподобной протеиназы 1 по сравнению с протеиназой 2. Если продуктивность культуры на 32 ч роста увеличивалась в 2–4 раза по сравнению с контролем, то продуктивность на 48 ч роста повышалась при добавлении дрожжевого экстракта в концентрациях 0.1 и 0.5% лишь на 50%. При повышении содержания дрожжевого экстракта в среде до 1% продуктивность культуры на 48 ч роста падала на 30% по отношению к контролю.

При внесении в среду овсяной муки в концентрациях 1, 2 и 3% наблюдалось увеличение биомассы культуры до 200% в сравнении с контролем, в то время как синтез субтилизиноподобных протеиназ 1 и 2 *B. pumilus* ингибировался на 90–97%. Соевая мука во всех концентрациях оказывала незначительное влияние на продуктивность культуры в отношении синтеза ферментов на 32 и 48 ч роста.

Таким образом, добавление в питательную среду овсяной и соевой муки для повышения выхода субтилизиноподобных протеиназ *B. pumilus* нецелесообразно. В случае дрожжевого экстракта добавление его в концентрации 0.1 и 0.5% позволяет повысить продуктивность культуры в 2–4 раза.

Протеолитические ферменты, являясь деградативными, могут подвергаться индукции субстратом. Из литературы известно положительное влияние сложных белковых субстратов на биосинтез некоторых внеклеточных протеиназ. Например, при внесении в среду желатина и казеина повышалась продуктивность культуры *B. intermedius* в отношении субтилизиноподобной протеиназы 1 [9].

Для изучения регуляции биосинтеза протеиназ путем индукции их образования белками или пептидами в исходную питательную среду добавляли казеин, желатин и гидролизат казеина в конечных концентрациях 0.1, 0.5 и 1.0%.

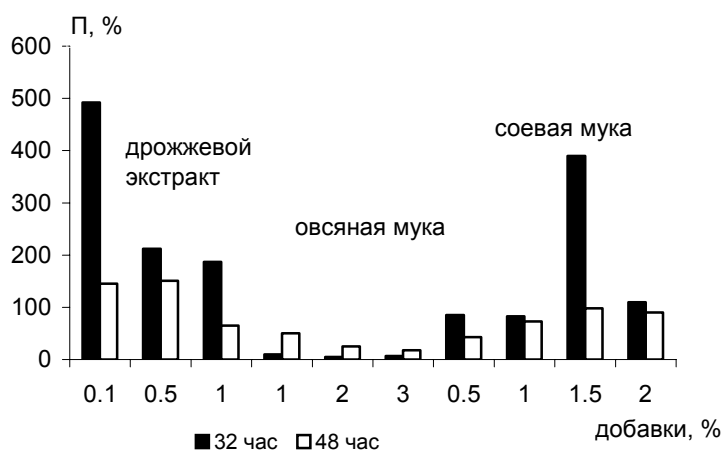


Рис. 3. Влияние дополнительных источников азота на биосинтез протеиназы *B. pumilus*. П – продуктивность культуры в отношении синтеза субтилизиноподобных протеиназ *B. pumilus*. За 100% принято значение продуктивности в отсутствие дополнительных источников азота

Из рис. 4 видно, что данный механизм малоэффективен для *B. pumilus*. Небольшое увеличение продуктивности синтеза субтилизиноподобных протеиназ наблюдается только в варианте с гидролизатом казеина в концентрации 0.1% (на 20% к контролю). Однако дальнейшее повышение концентрации приводило к снижению уровня синтеза ферментов, особенно протеиназы ранней стационарной фазы роста (на 80% от контроля); при этом рост культуры существенно не менялся.

Добавление в среду казеина в концентрации 0.1, 0.5 и 1.0% привело к увеличению количества образуемой биомассы на 30–50% и ингибированию синтеза протеиназ на 30–90%. Сходная закономерность обнаруживается и при добавлении в среду желатина, только его ингибирующее действие на биосинтез протеиназ оказалось менее выраженным по сравнению с казеином. Определенные различия на вводимые белки и пептиды наблюдались в реакции бактериальной культуры на разных стадиях роста (в отношении синтеза 1-й и 2-й субтилизиноподобной протеиназы). Интересно, что сходные результаты были получены при изучении биосинтеза сериновых протеиназ у двух морских бактерий – *Bacillus firmus* 44b и *Bacillus oligonitrophilus* 21p [10]. В этой работе показано, что внесение 1% казеина и желатина в ростовую среду приводило к снижению продуктивности синтеза исследуемых протеиназ у *Bacillus firmus* 44b на 15 и 60% соответственно. В случае *Bacillus oligonitrophilus* 21p влияние казеина и желатина оказалось сходным, но менее выраженным. На основании полученных результатов был сделан вывод, что синтез внеклеточных протеиназ у *Bacillus firmus* 44b и *Bacillus oligonitrophilus* 21p регулируется посредством репрессии-дерепрессии и, в частности, азотной катаболитной репрессии. Полученные данные по влиянию белковых субстратов на биосинтез субтилизиноподобных ферментов *B. pumilus* можно объяснить следующим образом. По-видимому, значительное снижение продуктивности синтеза ферментов обусловлено репрессией конечными продуктами азотного метаболизма. Одной из возмож-



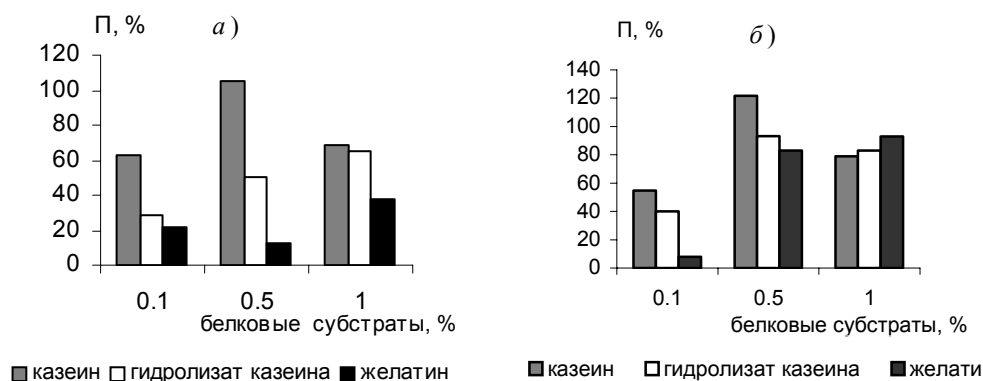


Рис. 4. Влияние сложных белковых субстратов на продукцию субтилизиноподобных протеиназ *B. pumilus*; а) продуктивность на 32 ч; б) продуктивность на 48 ч роста. П – продуктивность культуры в отношении синтеза протеиназ. За 100% принято значение продуктивности культуры в отсутствие дополнительных белковых субстратов в среде

ных функций внеклеточных протеолитических ферментов может быть создание запасов аминокислот для различных биосинтетических целей. Поэтому одним из наиболее оперативных и эффективных механизмов контроля их синтеза может быть репрессия конечными продуктами, которыми могут служить аминокислоты, накапливающиеся в результате гидролиза белковых субстратов, то есть азотная катаболитная репрессия.

Известно, что индивидуальные аминокислоты, внесенные в среду в качестве дополнительного источника азота, по-разному влияют на синтез протеолитических ферментов [11]. В некоторых случаях происходит индукция, в других репрессия синтеза протеиназ. В настоящей работе исследовано влияние двух аминокислот (лизина и валина) в концентрациях 0.1, 0.5 и 1% на синтез протеиназ *B. pumilus* (рис. 5). Лизин во всех концентрациях повышал продукцию субтилизиноподобной протеиназы 2 на 15–20%; однако уровень синтеза протеиназы 1, наоборот, снижался в присутствии этой аминокислоты на 30%. Валин в концентрации 0.1% снижал уровень продукции обеих протеиназ на 30 и 5% соответственно; дальнейшее повышение концентрации приводило к ингибированию синтеза ферментов вплоть до 50% в сравнении с контролем. При этом уровень биомассы культуры значительно не изменялся.

Известно, что регуляция синтеза протеиназ у различных видов *Bacillus* носит неадекватный характер, так как различные аминокислоты и их комбинации по-разному репрессируют синтез протеиназ у разных видов бактерий. Показано, например, что максимальная репрессия синтеза экзопроотеиназ у *Bacillus megaterium* KM достигается смесью изолейцина и треонина [12]. Для *Bacillus cereus* такая репрессия обнаружена при наличии в среде треонина и гистидина или смеси из 9 аминокислот, подавляющих также и споруляцию [13]. В случае *Bacillus subtilis* A-50 наибольший ингибирующий эффект обнаружен для смеси аминокислот из аспарагина, глутамина, аспарагиновой и глутаминовой кислот на фоне 1–5% глюкозы [11]. В то же время показано, что смесь аминокислот из

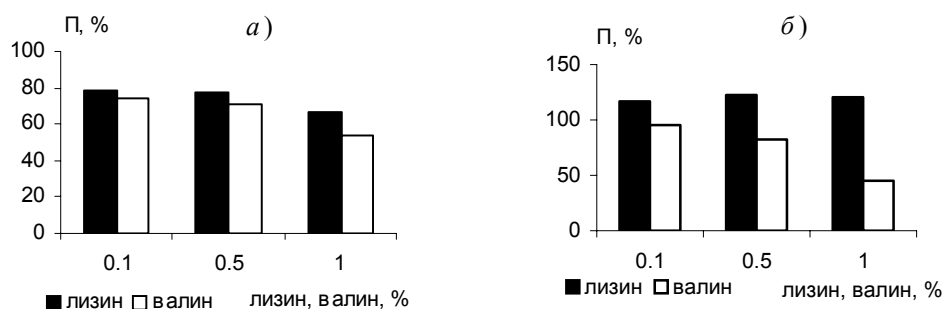


Рис. 5. Влияние аминокислот на продукцию субтилизиноподобных протеиназ *B. pumilus*. а) продуктивность на 32 ч роста, б) продуктивность на 48 ч роста. П – продуктивность культуры в отношении протеиназ. За 100% принято значение продуктивности культуры в отсутствие аминокислот в среде

аргинина, гистидина, метионина и лизина стимулирует синтез протеиназ на фоне 2% глюкозы примерно в 2 раза. Интересным фактом является то, что репрессорирующее действие аминокислот на синтез щелочной протеиназы *Bacillus subtilis A-50* не проявлялось на фоне низкой концентрации в среде глюкозы (0,5%) и обнаруживалось лишь при достижении концентрации аминокислот порядка 1.5 мг/мл на фоне 1–5% глюкозы.

Как видно из рис. 5, у *Bacillus pumilus*, как и в случае *Bacillus subtilis A-50*, обнаружено, что синтез экзопротеиназ зависит как от типа, так и концентрации аминокислот. Более выраженное репрессорирующее действие оказывала гидрофобная аминокислота валин по сравнению с гидрофильной аминокислотой лизином. При чем ингибирующее действие валина сильнее зависит от концентрации аминокислоты в питательной среде.

Таким образом, в ходе проведенных исследований определен состав питательной среды для повышения уровня синтеза субтилизиноподобных протеиназ *Bacillus pumilus*, подобрано оптимальное значение рН среды и условия аэрации. Установлено, что замена пептона на коллаген нецелесообразна, а добавление в среду казеина, желатина или индивидуальных аминокислот приводит к ингибированию продукции протеиназы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что синтез субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* может находиться под контролем азотной катаболитной репрессии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 05-04-48182а).

### Summary

*L.A. Malikova, A.M. Mardanova, O.V. Sokolova, N.P. Balaban, M.R. Sharipova.* Biosynthesis of extracellular subtilisin-like proteinase from *Bacillus pumilus*.

The conditions of growth and biosynthesis of subtilisin-like serine proteinase in the culture fluid of *Bacillus pumilus* were studied. Concentration of various exogenous factors for maximum production of the enzymes were established. The replacement of peptone by col-

lamine or glucose led to decreasing of proteinase specific activity. The influence of the different proteins, amino acids and other factors on the bacterial growth and proteinase synthesis were studied. Amino acids, casein and gelatin were shown to inhibit the production of proteinase by the mechanism of nitrogen repression.

### Литература

1. Rao M.B., Tanksale A.M., Chatge M.S., Deshpande V.S. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1998. – V. 62, No 3. – P. 597–635.
2. Даниличев В.Ф., Кнорринг Г.Ю. Системная энзимотерапия при патологии глаз // *Кремлевская медицина. Клинический вестн.* – 2002. – № 3. – С. 68–70.
3. Новые аспекты системной энзимологии: сб. науч. тр. / Под ред. В.А. Виссарионова. – М.: Триада Фарм., 2001.
4. Aoyama M., Toma S., Yasud M., Iwanaga M. Sequence of the gene encoding an alkaline serine proteinase of *Bacillus pumilus* TУO-67. // *Microbiol Immunol.* – 2000. – V. 44, No 5. – P. 389–393.
5. Люблинская Л.А., Хайду И., Баландина Г.Н. п-Нитроанилиды пироглутамилпептидов – хромогенные субстраты сериновых протеиназ // *Биоорг. химия* – 1987. – Т. 13, № 6. – С. 748–753.
6. 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* // *Микробиология.* – 2002. – Т. 71, № 4. – С. 494–499.
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* на поздних стадиях спорообразования // *Микробиология.* – 2003. – Т. 72, № 3. – С. 338–342.
8. Сафонова М.Е., Астапович Н.И., Буряко И.А. Особенности роста и продукции внеклеточных протеиназ *Lactobacillus plantarum* ИМ-9/138 // *Микробиология.* – 1999. – Т. 68, № 4. – С. 396–403.
9. Ицкович Е.Л., Знаменская Л.В., Балабан Н.П., Ершова Т.А., Лецинская И.Б. Биосинтез щелочной протеиназы *Bacillus intermedius* // *Микробиология.* – 1995. – Т. 64, № 5. – С. 623–629.
10. Ландау Н.С., Гуликова О.М., Егоров Н.С. Особенности контроля синтеза протеиназ с плазминоподобной и активаторной активностями у морских бактерий // *Микробиология.* – 2000. – Т. 69, № 2. – С. 185–190.
11. Добржанская Е.О., Ерохина Л.И. К вопросу о регуляции синтеза щелочной протеиназы у *Bacillus subtilis* A-5 // *Генетика.* – 1975. – Т. XI, № 17. – С. 135–144.
12. Chaloupka J., Kreckova P. Protease repression in *Bacillus megaterium* KM // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1962. – V. 8. – P. 120–124.
13. Aronson A.J., Angelo N., Holt S.C. Regulation of extracellular protease production in *Bacillus cereus* T. Characterisation of mutants production altered amounts of protease // *J. Bacteriol.* – 1971. – V. 106, No 3. – P. 1016–1025.

Поступила в редакцию  
27.03.06

---

Маликова Лилия Александровна – аспирант кафедры микробиологии Казанского государственного университета.  
E-mail: [lilianna\\_kazan@mail.ru](mailto:lilianna_kazan@mail.ru)

**Марданова Айслу Миркасымовна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

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

**Соколова Ольга Владимировна** – студент биологического факультета Казанского государственного университета.

E-mail: *keepintouch@mail.ru*

**Балабан Нелли Павловна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: *Nelly.Balaban@ksu.ru*

**Шарипова Маргарита Рашидовна** – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

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