

УДК 579.22:579.852.11

**ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ
ПРОДУКЦИИ ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗ,
СЕКРЕТИРУЕМЫХ В СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ РОСТА
BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS H2**

*Л.А. Маликова, Н.П. Балабан, Л.А. Габдрахманова,
А.М. Марданова, М.Р. Шарипова*

Аннотация

В стационарной фазе роста бактерии *Bacillus amyloliquefaciens* секретируют глутамилэндопептидазы, относящиеся к классу сериновых протеиназ. Анализ динамики роста и накопления фермента в культуральной жидкости *B. amyloliquefaciens* показал, что максимальная протеолитическая активность обнаруживается в ранней стационарной фазе на 22-й час (глутамилэндопептидаза 1) и в поздней стационарной фазе на 46-й час роста (глутамилэндопептидаза 2).

В двухфакторных экспериментах подобраны оптимальные для биосинтеза ферментов соотношения концентраций основных компонентов питательной среды – пептона и неорганического фосфата. Исследовано влияние дополнительных источников азота и углерода на уровень активности протеиназ в культуральной жидкости. Установлено, что ионы аммония, внесенные в питательную среду в виде хлорида аммония, значительно снижают продукцию глутамилэндопептидаз *B. amyloliquefaciens*. Цитрат аммония индуцирует синтез обеих протеиназ, повышая продуктивность культуры в 1.5–2 раза. Показано, что глюкоза, внесенная в питательную среду перед засевом, ингибирует биосинтез глутамилэндопептидаз по типу катаболитной репрессии. Внесение глюкозы в позднюю стационарную фазу роста не влияет на уровень продукции ферментов.

Введение

Большие перспективы использования протеолитических ферментов диктуют необходимость поиска как новых продуцентов, так и путей увеличения выхода протеиназ. На них приходится 40% от мирового объема производства всех ферментов [1]. Микроорганизмы являются удобными источниками протеиназ, так как выход ферментов может быть существенно увеличен за счет воздействия на условия роста, в частности, при варьировании состава питательной среды. Активными продуцентами широкого спектра протеиназ с различными свойствами являются бациллы. Исследование закономерностей биосинтеза известных протеолитических ферментов бацилл позволит направленно влиять на уровень продукции тех из них, которые имеют практическую ценность, а также приблизит нас к пониманию функциональной роли протеиназ в клетке. Подбор оптимальных условий культивирования для получения максимального выхода протеиназ является первым этапом работы по установлению механизмов биосинтеза ферментов.

Бактерии *B. amyloliquefaciens* секретируют в среду сериновые протеиназы, среди которых обнаружены глутамилэндопептидазы, обладающие строгой субстратной специфичностью к пептидным связям, образованным дикарбоновыми кислотами. В литературе очень мало данных о закономерностях биосинтеза этих ферментов. Получение информации о новом представителе малоизученного подсемейства глутамилэндопептидаз позволит пополнить наши знания об этих ферментах.

Целью данной работы является оптимизация состава питательной среды для получения эффективной продукции глутамилэндопептидаз *B. amyloliquefaciens*.

1. Материалы и методы исследования

В работе использовали штамм *B. amyloliquefaciens* Н2 из коллекции кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

Исходной питательной средой для культивирования служила среда следующего состава (г/л): пептон – 20 г/л, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.3, NaCl – 3.0, MnSO_4 – 0.1, pH 8.5 [2]. Среду стерилизовали при 1 атм.

Для изучения биосинтеза глутамилэндопептидаз *B. amyloliquefaciens* в разные варианты состава питательной среды вносили пептон в конечной концентрации 10–35 г/л. Растворы неорганического фосфата ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), цитрата аммония ($\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_5\text{COONH}_4$) и хлористого аммония (NH_4Cl) стерилизовали отдельно при 1 атм и вносили в среду перед посевом: неорганический фосфат – в конечной концентрации 0.1–0.3 г/л, растворы солей аммония – в конечной концентрации 1–5 мМ.

Культивирование бактерий проводили при температуре 30°C на вибростенде с интенсивностью качания 200 об/мин, при соотношении объема среды к объему колбы, равном 1 : 5. Посевным материалом служила 12–15-часовая культура (1% v/v).

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.

Определение протеолитической активности проводили по методу, описанному ранее [3]. Субстратом служил специфический для глутамилэндопептидаз синтетический хромогенный субстрат Z-Glu-pNA, полученный в лаборатории Химического факультета Московского государственного университета. За единицу активности принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкМ субстрата за 1 мин.

Продуктивность культуры рассчитывали как отношение ферментативной активности к оптической плотности культуральной жидкости.

При изучении спорообразования в качестве инокулята использовали 50-часовую культуру. Для получения синхронной культуры инокулят кратковременно прогревали при 80°C 5–6 раз по 30 с. Для подсчета свободных спор клетки окрашивали по Пешкову [4], при этом свободные споры окрашивались в синий цвет, а вегетативные и спорующие клетки – в ярко-розовый. Количество спор выражали в процентах по отношению к общему количеству вегетативных и спорующих клеток (100%), подсчет которых проводили в

режиме фазово-контрастной микроскопии (микроскоп Carl Zeiss Jena) при увеличении в 1600 раз в 5–10 полях зрения.

Результаты двухфакторных экспериментов обрабатывали с помощью комплекса программ BIOPT [5].

2. Результаты и обсуждение

2.1. Динамика биосинтеза глутамилэндопептидазы. Бактерии *B. amylo-liquefaciens* секретируют в среду сериновые протеиназы, среди которых обнаружена глутамилэндопептидаза, относящаяся к семейству химотрипсинов класса сериновых протеиназ. С помощью специфического хромогенного субстрата Z-Glu-pNA в культуральной жидкости обнаружены две фракции ферментативной активности (рис. 1). Фермент первой фракции появляется в среде на 14-й час роста и достигает максимума активности в начале стационарной фазы роста на 22-й час – глутамилэндопептидаза 1 («ранний» белок), максимум активности второй фракции определяется в конце стационарной фазы роста на 46-й час – глутамилэндопептидаза 2 («поздний» белок). В литературе практически нет данных о биосинтезе глутамилэндопептидаз в поздней стационарной фазе роста бактерий. Ранее в нашей лаборатории в культуральной жидкости *B. intermedius* 3–19 были обнаружены две глутамилэндопептидазы, причем максимум накопления глутамилэндопептидазы 1 наблюдался значительно раньше, чем для глутамилэндопептидазы 1 *B. amyloliquefaciens*, а именно в позднюю логарифмическую фазу роста на 18-й час [6]. Максимумы накопления «поздних» белков – глутамилэндопептидаз 2 – для *B. amyloliquefaciens* и *B. intermedius* совпадают: 44–46-й час роста культуры.

2.2. Динамика спорообразования. Для решения вопроса о том, является ли глутамилэндопептидаза 2 секретлируемым белком, была исследована динамика спорообразования. Из рис. 1 видно, что к моменту максимального накопления глутамилэндопептидазы 2 в культуральной жидкости количество свободных спор не превышает 10%, это позволяет предположить, что максимальное накопление глутамилэндопептидазы 2 на 46-й час роста не связано с лизисом клеток. Следовательно, глутамилэндопептидаза 2 *B. amyloliquefaciens* является секретлируемым ферментом. Резкое увеличение количества свободных спор наблюдается после 60-го часа роста культуры и к 70-му часу достигает уровня 60%. Все последующие исследования мы проводили с секретлируемыми глутамилэндопептидазами стационарной фазы роста *B. amyloliquefaciens*.

2.3. Влияние концентраций пептона и неорганического фосфата на биосинтез глутамилэндопептидаз *B. amyloliquefaciens*. Так как синтез внеклеточных ферментов в значительной степени определяется составом среды культивирования, мы исследовали влияние основных компонентов питательной среды – пептона и неорганического фосфата – на накопление «раннего» и «позднего» белков. Ранее при изучении локализации протеиназ в клетках *B. intermedius* 3–19 было показано, что на среде без неорганического фосфата возрастает доля протеиназы во фракции клеточной стенки и уменьшается в культуральной

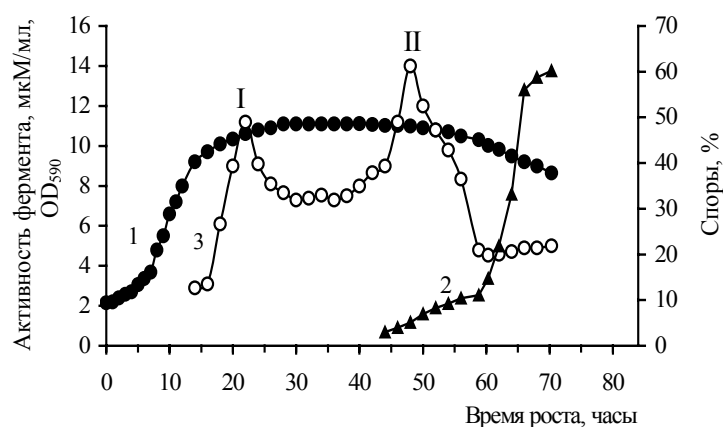


Рис. 1. Динамика роста, спорообразования и биосинтеза глутамилэндопептидаз *Bacillus amyloliquefaciens* H2 1 – OD₅₉₀, 2 – спорообразование, 3 – активность глутамилэндопептидазы; I – глутамилэндопептидаза 1, II – глутамилэндопептидаза 2

жидкости. По-видимому, неорганический фосфат оказывает опосредованное влияние на выход ферментов из клеток, что связано с образованием резервного пула гидролаз в поверхностном слое клеток бактерий [7].

В двухфакторных экспериментах были установлены оптимальные концентрации пептона и неорганического фосфата (Φ_n) для синтеза глутамилэндопептидазы 1 и 2. Концентрации указанных факторов варьировали на трех уровнях. Принятые уровни указанных факторов и усредненные по трем повторностям значения активности и продуктивности культуры в отношении синтеза протеиназ сведены в табл. 1 и 2.

Зависимость накопления ферментов в культуральной жидкости от концентраций пептона и неорганического фосфата в среде представлена на рис. 2, а, б в виде линий уровня активностей. При этом убедительно показано, что концентрации пептона 25 и 18 г/л, а также неорганического фосфата 0.3 и 0.38 г/л, соответственно, для глутамилэндопептидаз 1 и 2 находятся внутри области эксперимента, которая ограничена со всех сторон линией уровня y .

Полученные результаты позволяют сделать заключение, что указанные концентрации пептона и неорганического фосфата являются оптимальными для биосинтеза глутамилэндопептидаз ранней и поздней стационарных фаз *B. amyloliquefaciens*. При обработке полученных экспериментальных данных по продуктивности культуры в отношении синтеза исследуемых ферментов с помощью программы «Биопт» были получены оптимумы, совпадающие с оптимумами протеиназной активности, поэтому линии уровня продуктивности *B. amyloliquefaciens* здесь не приводятся.

Интересно отметить, что для глутамилэндопептидаз *B. intermedius* 3–19 показано, что разница в содержании пептона невелика (20 и 19 г/л соответственно), однако есть отличие в содержании неорганического фосфата в среде – 0.2 и 0.3 г/л соответственно [8, 9]. Таким образом, полученные результаты отличаются от известных для глутамилэндопептидаз *B. intermedius*.

Табл. 1

Оптимизация состава питательной среды для биосинтеза глутамилэндопептидазы 1 *B. amyloliquefaciens* (результаты представлены в виде среднее значение \pm стандартное отклонение, $n = 3$)

| Уровни факторов | | | | Биомасса, опт. ед. | Активность, мкМ/мл | Продуктивность усл. ед. |
|-----------------|-----|----------|-----|-----------------------|-----------------------|----------------------------|
| Пептон | | Φ_n | | | | |
| X1 | г/л | X2 | г/л | | | |
| + | 35 | + | 0.4 | 7.2 | 6.2 ± 0.75 | 0.86 ± 0.081 |
| - | 15 | + | 0.4 | 3.6 | 2.5 ± 0.32 | 0.69 ± 0.075 |
| + | 35 | - | 0.2 | 9.2 | 3.7 ± 0.41 | 0.4 ± 0.048 |
| - | 15 | - | 0.2 | 9.2 | 4.9 ± 0.57 | 0.53 ± 0.06 |
| + | 35 | 0 | 0.3 | 9.2 | 4.8 ± 0.54 | 0.52 ± 0.061 |
| - | 15 | 0 | 0.3 | 8.9 | 7.4 ± 0.81 | 0.83 ± 0.087 |
| 0 | 25 | + | 0.4 | 8.9 | 6.4 ± 0.73 | 0.72 ± 0.078 |
| 0 | 25 | - | 0.2 | 10.3 | 6.3 ± 0.68 | 0.62 ± 0.065 |

Табл. 2

Оптимизация состава питательной среды для биосинтеза глутамилэндопептидазы 2 *B. amyloliquefaciens* (результаты представлены в виде среднее значение \pm стандартное отклонение, $n = 3$)

| Уровни факторов | | | | Биомасса, опт. ед. | Активность, мкМ/мл | Продуктивность усл. ед. |
|-----------------|-----|----------|-----|-----------------------|-----------------------|----------------------------|
| Пептон | | Φ_n | | | | |
| X1 | г/л | X2 | г/л | | | |
| + | 30 | + | 0.4 | 12.6 | 6.17 ± 0.63 | 0.49 ± 0.52 |
| - | 10 | + | 0.4 | 3.9 | 7.4 ± 0.81 | 1.9 ± 0.02 |
| + | 30 | - | 0.2 | 10.2 | 8.6 ± 0.89 | 0.84 ± 0.07 |
| - | 10 | - | 0.2 | 3.4 | 7.4 ± 0.76 | 2.18 ± 0.23 |
| + | 30 | 0 | 0.3 | 12.4 | 6.17 ± 0.63 | 0.5 ± 0.061 |
| - | 10 | 0 | 0.3 | 5.2 | 8.6 ± 0.92 | 1.65 ± 0.18 |
| 0 | 20 | + | 0.4 | 10 | 12.3 ± 1.05 | 1.23 ± 0.13 |
| 0 | 20 | - | 0.2 | 7.2 | 7.4 ± 0.78 | 1.028 ± 0.12 |

2.4. Влияние дополнительных источников азота на биосинтез глутамилэндопептидаз *B. amyloliquefaciens*. Известно, что дополнительные соединения азота в сочетании с пептоном могут существенно влиять на синтез и секрецию ферментов. Исследовали влияние ионов аммония как дополнительного источника азота на биосинтез глутамилэндопептидаз 1 и 2 *B. amyloliquefaciens* (рис. 3). Ионы аммония вносили в среду в виде органической и неорганической солей – цитрата аммония ($C_5H_7O_5COONH_4$) и хлорида аммония (NH_4Cl) – в конечных концентрациях 1, 3 и 5 мМ.

Для глутамилэндопептидаз *B. amyloliquefaciens* показано, что хлорид аммония во всех концентрациях значительно снижал продукцию обоих ферментов (до 60%) (рис. 3, а). По-видимому, это обусловлено репрессией синтеза ферментов ионами аммония как конечными продуктами азотного метаболизма. Другие результаты были получены для глутамилэндопептидаз ранней стационарной фазы роста, секретлируемых природным штаммом *B. intermedius* и рекомбинантным штаммом *B. subtilis*, несущим ген глутамилэндопептидазы *B. interme*

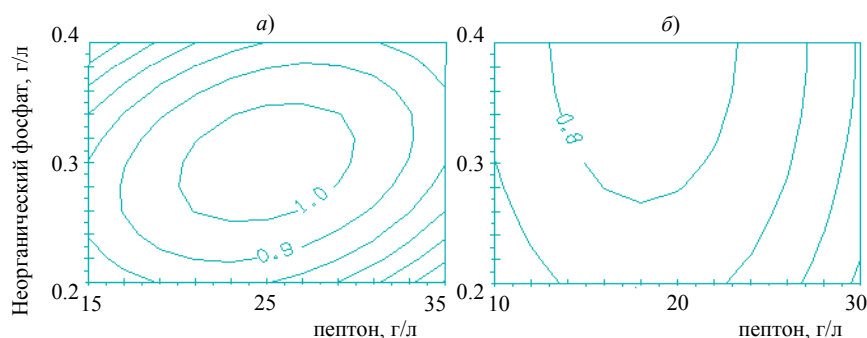


Рис. 2. Линии уровня активности глутамилэндопептидазы 1 (а) и глутамилэндопептидазы 2 (б) *B. amyloliquefaciens* в двухфакторных экспериментах. За единицу принята максимальная активность ферментов

dius. Показано, что хлорид аммония в тех же концентрациях приводил к повышению продукции этих ферментов [9, 10].

Цитрат аммония в концентрации 1 мМ не изменял продуктивность культуры относительно глутамилэндопептидазы 1 и повышал продукцию «позднего» фермента на 30%. Повышение концентрации соли в среде до 3 мМ приводило к интенсификации биосинтеза обоих глутамилэндопептидаз в 1.5–2 раза (рис. 3, б). Цитрат аммония в концентрации 5 мМ практически не изменял интенсивность биосинтеза глутамилэндопептидазы 1, но снижал продуктивность глутамилэндопептидазы 2 до уровня контроля. Таким образом, концентрация цитрата аммония 3 мМ является оптимальной для индукции синтеза глутамилэндопептидаз 1 и 2 *B. amyloliquefaciens*. Эти результаты отличаются от данных, полученных для глутамилэндопептидазы 2 *B. intermedius*: цитрат аммония снижает продукцию этого фермента на 30% [8].

Интересно, что добавление в питательную среду ионов аммония стимулировало секрецию всех экзоферментов у *Asp. oryzae*, однако для *Asp. nidulans* было показано, что в присутствии минеральных источников азота наблюдалась репрессия синтеза и секреции внеклеточной протеазы [11]. Обнаружен репрессирующий эффект сульфата аммония и других солей аммония на секрецию кислой протеиназы *Candida albicans* [12]. Также было показано, что в присутствии неорганического азота снижалась протеолитическая активность и продуктивность микромицета *Alternaria alternata* [13]. Таким образом, ионы аммония по-разному влияют на биосинтез протеиназ, секретируемых представителями различных таксономических групп.

2.5. Влияние глюкозы на биосинтез глутамилэндопептидаз *B. amyloliquefaciens*. Известно, что большинство индуцируемых ферментов, в том числе и сериновые протеиназы, чувствительно к катаболитной репрессии: в присутствии глюкозы скорость роста культуры увеличивается, а синтез ферментов подавляется. Например, на среде, содержащей 1% глюкозы, репрессируется синтез щелочной протеиназы *B. subtilis* и нейтральной протеиназы *B. mesentericus*, хотя при этом наблюдается увеличение биомассы [14]. В то же время показано, что биосинтез протеиназ *B. oligonitrophilus* и *B. firmus* лишь в незначительной сте-

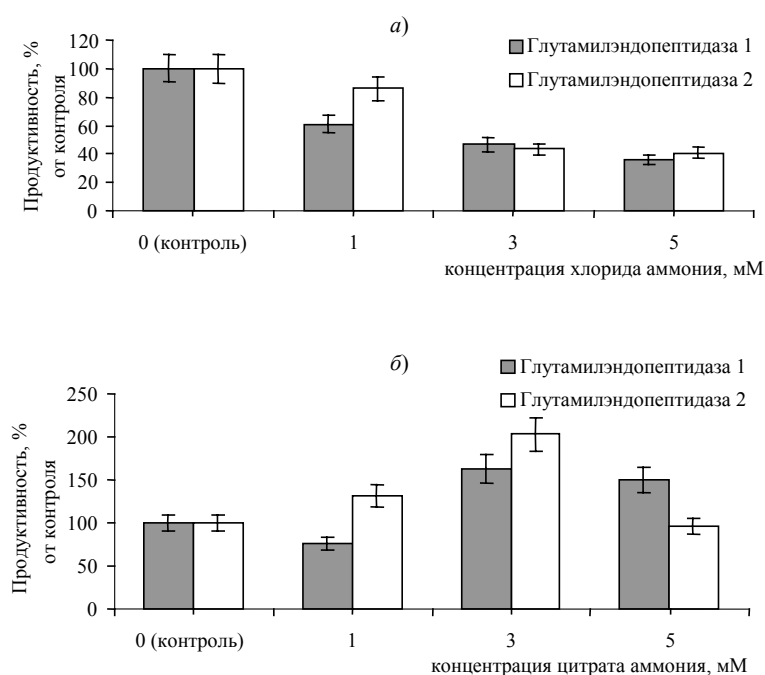


Рис. 3. Влияние хлорида (а) и цитрата (б) аммония на продукцию глутамилэндопептидаз *B. amyloliquefaciens* (за 100% принята продуктивность на контрольной среде)

пени подвержен катаболитной репрессии [15]. Нами установлено, что при внесении в среду 1% глюкозы перед началом культивирования уровень продукции глутамилэндопептидаз *B. amyloliquefaciens* резко снижается (рис. 4), что свидетельствует об участии катаболитной репрессии в регуляции биосинтеза этих ферментов. Однако, внесение глюкозы в позднюю стационарную фазу роста культуры (на 38–40-й ч роста) не влияло на биосинтез глутамилэндопептидазы 2 (рис. 5). По-видимому, на поздних стадиях развития культуры биосинтез протеиназ регулируется по иному механизму, нежели катаболитная репрессия. Сходные результаты получены для глутамилэндопептидаз *B. intermedius* [16].

В результате проведенных исследований показано, что бактерии *B. amyloliquefaciens* секретируют в среду глутамилэндопептидазы, максимумы накопления которых приходятся на раннюю и позднюю стационарные фазы роста. Подбран состав оптимальных питательных сред, позволяющих получить максимальный выход этих ферментов (г/л). Для глутамилэндопептидазы 1: пептон – 25, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0.3, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.3, NaCl – 3.0, MnSO_4 – 0.1, $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_5\text{COONH}_4$ – 0.63; для глутамилэндопептидазы 2: пептон – 18, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0.38, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.3, NaCl – 3.0, MnSO_4 – 0.1, $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_5\text{COONH}_4$ – 0.63. Выявлено, что ионы аммония в составе неорганической и органической солей оказывают различное влияние на продукцию глутамилэндопептидаз *B. amyloliquefaciens*. Присутствие в среде хлорида аммония приводит к ингибированию по типу азотметаболической репрессии, в то время как цитрат аммония индуцирует синтез этих ферментов. В экспериментах с внесением глюкозы в питательную среду на разные часы роста (0-й и 38–40-й) показано, что рост культуры в присутствии глюкозы в среде

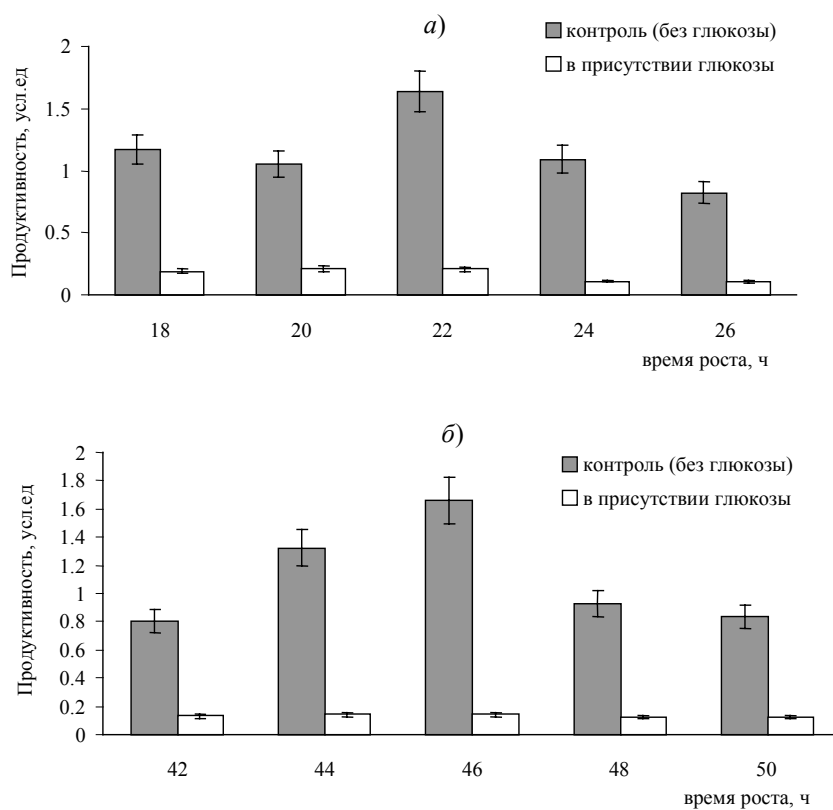


Рис. 4. Влияние глюкозы, внесенной в питательную среду перед засевом на продукцию глутамилэндопептидаз 1 (а) и 2 (б) *B. amyloliquefaciens*

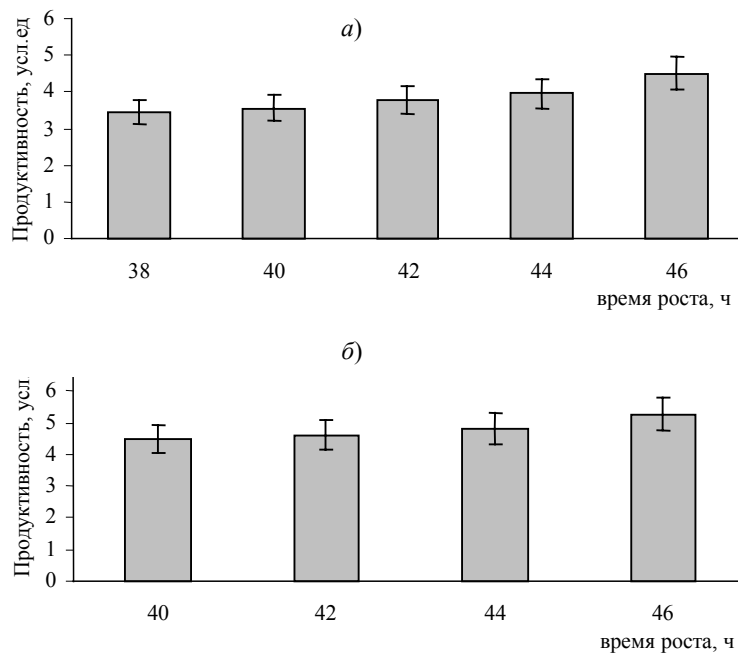


Рис. 5. Влияние глюкозы, внесенной в питательную среду на 38 (а) и 40 (б) часы роста на продукцию глутамилэндопептидазы 2 *B. amyloliquefaciens*

приводит к репрессии синтеза протеиназ по механизму катаболитной репрессии. В то же время внесение глюкозы в позднюю стационарную фазу роста не приводит к снижению продукции глутамилэндопептидазы 2, это позволяет предположить, что на поздних стадиях роста включаются другие механизмы регуляции синтеза этого фермента.

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

Summary

L.A. Malikova, N.P. Balaban, L.A. Gabdrakhmanova, A.M. Mardanova, M.R. Sharipova. The cultivation medium for the effective production of *Bacillus amyloliquefaciens* H2 glutamyl endopeptidases secreted in stationary stage of growth.

B. amyloliquefaciens H2 secrete glutamyl endopeptidases, which were classified as serine proteinases. Analysis of the dynamics of *B. amyloliquefaciens* growth and proteinase biosynthesis revealed two maxim of enzyme activity of glutamyl endopeptidase: at the beginning of stationary phase (22 h – glutamyl endopeptidase 1) and during late stationary phase (46 h – glutamyl endopeptidase 2). Composition of culture medium yielding maximum enzyme production by *B. amyloliquefaciens* was developed, employing response surface methodology. Effect of additional nitrogen sources on proteinase synthesis was examined. Production of glutamyl endopeptidases from *B. amyloliquefaciens* decreased in the presence of NH_4Cl . Ammonium citrate stimulated synthesis of both proteinases, increase the production of culture. We have been shown, that the addition into the medium of 1% glucose prior to cultivation of *B. amyloliquefaciens* repressed drastically glutamyl endopeptidases synthesis. In the same time, addition of glucose at the late stationary phase did not show repressive effect to biosynthesis of glutamyl endopeptidase 2.

Литература

1. Mala B.R., Aparna M.T., Mohini S.G., Vasanti V.D. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 1998. – V. 62, No 3. – P. 597–635.
2. Знаменская Л.В., Ромахина М.А., Филатова С.В. Биосинтез внеклеточных ферментов *B. intermedius* // Микробиология. – 1995. – Т. 64, № 5. – С. 66–69.
3. Люблинская Л.А., Хайду И., Баландина Г.Н. П-нитроанилиды пироглутамилпептидов – хромогенные субстраты сериновых протеиназ // Биоорг. химия. – 1987. – Т. 13, № 6. – С. 748–753.
4. Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. – 221 с.
5. Краснов С.И., Знаменская Л.В. Комплекс программ “БИОРТ” для оптимизации в биологических исследованиях // Биол. науки. – 1992. – № 2. – С. 15–18.
6. 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 *B. intermedius* на поздних стадиях спорообразования // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 3. – С. 338–342.
7. Шарипова М.Р., Шакиров Е.В., Балабан Н.П., Габдрахманова Л.А., Шилова М.А., Руденская Г.Н., Лецинская И.Б. Локализация протеолитических ферментов в клетках *B. intermedius* // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 5. – С. 660–667.

8. Габдрахманова Л.А., Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Токмакова Ю.С., Соколова Е.А., Руденская Г.Н., Лецинская И.Б. Оптимизация среды культивирования для продукции глутамилэндопептидазы *B. intermedius* 3-19 // Микробиология. – 2002. – Т. 71, № 3. – С. 323–329.
9. 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 *B. intermedius* 3-19 // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 1. – С. 29–33.
10. 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 *B. subtilis* // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 5. – С. 653–659.
11. Безбородов А.М., Астапович Н.И. Секреция ферментов у микроорганизмов. – М.: Наука. – 1984. – С. 58.
12. Banerjee A., Janesan K., Dallis A. Induction of secretory acid proteinases in *Candida albicans* // J. Gen. Microbiology. – 1991. – V. 137. – P. 2455–2461.
13. Дунаевский Я.Е., Грубань Т.Н., Белякова Г.А. Влияние состава среды на количественный и качественный состав внеклеточных протеаз микромицетов // Микробиология. – 1999. – Т. 68, № 3. – С. 324–329.
14. Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1979. – С. 264.
15. 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.
16. Balaban N.P., Gabdrakhmanova L.A., Sharipova M.R., Mardanova A.M., Sokolova E.A., Malikova L.A., Leshchinskaya I.B. Selection of cultivation medium for production of late phase serine proteinases from *B. intermedius* // J. Basic Microbiol. – 2004. – V. 44, No 6. – P. 415–423.

Поступила в редакцию
14.04.06

Маликова Лилия Александровна – аспирант кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: Lilianna_kazan@mail.ru

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

E-mail: Nelly.Balaban@ksu.ru

Габдрахманова Лейла Асхатовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: Leila.Gabdrakhmanova@ksu.ru

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

E-mail: Ayslu.Mardanova@ksu.ru

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

E-mail: Margarita.Sharipova@ksu.ru