

Создание эффективного продуцента протеиназ бацилл.

Научный руководитель – Шарипова Маргарита Рашидовна

Солодкая Анастасия Владимировна

Студент (бакалавр)

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной
медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия

E-mail: ty-you@yandex.ru

Особый интерес в области микробных ферментов представляет класс сериновых протеиназ. Такие ферменты широко используются в медицине (в качестве тромболитиков и антикоагулянтов), в животноводстве (в качестве кормовых добавок), а также в ферментативном синтезе пептидных связей. В настоящей работе для получения сериновых протеиназ *Bacillus pumilus* (субтилизиноподобной и глутамилэндопептидазы) была использована оптимизированная LIKE экспрессионная система (from the German “LIa-Kontrollierte Expression”), сконструированная на основе сильного индуцируемого промотора *liaH*-оперона *B. subtilis* и рекомбинантных сигнальных пептидов *B. Megaterium*. Ранее с помощью компьютерной программы SignalP было показано, что наиболее эффективной сигнальной последовательностью для продукции глутамилэндопептидазы является сигнальный пептид гена гликозидгидролазы *B. megaterium* (SPYngk); для продукции субтилизиноподобной протеиназы эффективным оказался смоделированный сигнальный пептид (SPAsp). Гены субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* (ArgVp) и глутамилэндопептидазы *B. pumilus* (GseVp) были клонированы в оптимизированную LIKE систему экспрессии. Важным этапом создания высокоэффективного продуцента является подбор штамма-реципиента. Рекомбинантные конструкции были трансформированы в штамм *B. subtilis* BG2036, в котором делетированы гены двух внеклеточных протеиназ *aprE* и *nprE* и *B. subtilis* 27-31, в геноме которого инактивированы гены спорообразования, антимикробных метаболитов, образования биопленок и внеклеточных протеиназ. Для качественной оценки эффективности работы экспрессионной системы проводили скрининг рекомбинантных конструкций на молочном агаре. Протеолитическую активность определяли по появлению зон просветления на питательной среде которые указывают на расщепление белков молока. Было показано, что штамм *B. subtilis* ПГ 27-31 содержащий глутамилэндопептидазу под контролем SPYngk проявляет наибольшую протеолитическую активность после добавления индуктора; обнаружено качественное увеличение активности.

Изучали динамику роста рекомбинантных штаммов без добавления и с добавлением индуктора (бацитрацин - 50 мг/мл). Протеолитическая активность определялась по гидролизу азоказеина. У штамма *B. subtilis* MRB086, содержащего ген GseVp протеиназы под контролем SPYngk после добавления в среду индуктора возрастала в ≈ 10 раз на 12 ч роста, по сравнению со штаммом *B. subtilis* MRB084, где GseVp протеиназа содержала собственный сигнальный пептид. У штамма *B. subtilis* MRB084, содержащего ген ArgVp протеиназы под контролем SPAsp при добавлении индуктора активность ArgVp повышалась в ≈ 3 раза по сравнению со штаммом под контролем собственного сигнального пептида MRB 081. Таким образом, замена собственного сигнального пептида генов субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы на рекомбинантные сигнальные пептиды (SPAsp и SPYngk, соответственно) в сочетании с эффективным штаммом продуцентом способствовала увеличению активности ферментов.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 19-08-00853_A).