На правах рукописи

МАЛИКОВА ЛИЛИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

ПРОТЕИНАЗЫ И АЛЬДОЛАЗЫ: ПРИНЦИПИАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2007

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии биолого-почвенного факультета ГОУВПО «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина».

Научный руководитель**:** Кандидат биологических наук, доцент
Марданова Айслу Миркасымовна

Официальные оппоненты**:** Доктор биологических наук, старший научный сотрудник Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН
Чернова Ольга Александровна

Доктор биологических наук, профессор Казанского государственного университета
Селивановская Светлана Юрьевна

Ведущая организация**:** Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН (г. Москва)

Защита диссертации состоится «26» апреля 2007 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета

Автореферат разослан «23» марта 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук З.И. Абрамова

Актуальность проблемы. Ферментные препараты, обладающие высокой активностью и специфичностью, являются неотъемлемой частью современных биотехнологических процессов, обеспечивая их эффективность и экологическую безопасность. Альдолазы и протеиназы представляют собой уникальные биологические катализаторы, способные осуществлять реакции расщепления и синтеза молекул. Альдолазы – это эффективные инструменты для синтеза различных сахаров – предшественников в получении ксилита, некоторых лекарственных, антифунгицидных препаратов и других соединений, используемых в промышленности. Среди альдолаз особый интерес представляют фруктозо-6-фосфат-альдолаза *E.coli* и трансальдолаза *B.subtilis*, способные использовать в синтезе различных кето-сахаров недорогой дигидроксиацетон, в отличие от других альдолаз, утилизирующих дорогостоящий фосфодигидроацетон (Shurmann et al., 2001). Одну из важнейших групп индустриальных ферментов представляют протеиназы микроорганизмов, широко используемые в различных областях промышленности, медицины и молекулярной биологии (Gupta et al., 2002; Rao et al., 1998). Интересна способность протеиназ к синтезу олигопептидов, поскольку направленный ферментативный синтез пептидной связи имеет ряд преимуществ перед химическим синтезом. Бактерии *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* являются известными продуцентами сериновых протеаз, в частности, субтилизиноподобных протеиназ, имеющих практическую ценность. Гены некоторых из них клонированы и секвенированы (Wells et al., 1983; Hung et al., 2003; Aoyama et al., 2000; Pan and Huang, 2004). Однако недостаточно исследованы тромболитические, антикоагулянтные, пептидсинтетические свойства, а также закономерности биосинтеза внеклеточных протеиназ этих бацилл.

Практическая ценность альдолаз и протеиназ диктует необходимость получения высокоэффективных продуцентов этих ферментов. Различная локализация в клетке и особенности биосинтеза этих белков определяют выбор стратегии повышения продуктивности культур. Альдолазы – это внутриклеточные ферменты, синтезируемые клеткой в небольших количествах, поэтому для препаративного получения этих белков предпочтительным является использование генно-инженерных методов. Уровень синтеза внеклеточных протеиназ сильно зависит от ряда факторов, в частности, от состава питательной среды, что позволяет значительно повысить выход ферментов за счет оптимизации условия биосинтеза.

Таким образом, перспективы применения протеиназ и альдолаз, в частности, в медицине и для синтеза соединений, используемых в промышленности, определяют актуальность поиска новых продуцентов этих ферментов.

Целью работы явилось выделение и характеристика внеклеточных протеиназ из природных штаммов *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* и внутриклеточных альдолаз из рекомбинантных штаммов *E.coli* с использованием подходов, основанных на оптимизации условий биосинтеза ферментов и генно-инженерных модификациях продуцентов.

Основные задачи исследования:

1. Установить особенности биосинтеза внеклеточных сериновых протеиназ штаммами *B.amyloliquefaciens* H2 и *B.pumilus* KMM 62 и получить высокий уровень продукции ферментов путем оптимизации состава питательных сред.
2. Получить рекомбинантные продуценты внутриклеточных ферментов: трансальдолазы *Bacillus subtilis* и фруктозо-6-фосфат-альдолазы A129S *Escherichia coli* и исследовать экспрессию клонированных генов.
3. Выделить и очистить субтилизиноподобные протеиназы и глутамилэндопептидазы природных штаммов *B.amyloliquefaciens* H2 и *B.pumilus* KMM 62, а также трансальдолазу и фруктозо-6-фосфат-альдолазу A129S из рекомбинантных штаммов *E.coli*.
4. Охарактеризовать энзиматические свойства, субстратную специфичность, а также тромболитическую, антикоагулянтную, фибринолитическую и пептидсинтетическую активность протеиназ.
5. Оценить эффективность синтетической активности трансальдолазы и фруктозо-6-фосфат-альдолазы A129S в отношении синтеза сахаров из различных субстратов.

Научная новизна. Впервые выделены и охарактеризованы глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобные протеиназы, секретируемые штаммами *B.amyloliquefaciens* H2 и *B.pumilus* KMM 62. Определены условия для эффективного биосинтеза ферментов и разработаны питательные среды для получения протеиназ в препаративных количествах.

Впервые установлено, что субтилизиноподобные протеиназы *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* обладают тромболитическими и антикоагулянтными свойствами. Получены приоритетные данные о наличии тромболитической, фибринолитической, антикоагулянтной активности у глутамилэндопептидаз *B.amyloliauefaciens*.

Впервые показано, что фруктозо-6-фосфат-альдолаза с мутацией в активном центре A129S, выделенная из рекомбинантных клеток *E.coli*, способна эффективно катализировать реакцию образования ксилулозы из дигидроксиацетона и гликольальдегида.

Практическая значимость. Примененные в работе подходы по оптимизации состава питательной среды и клонированию генов альдолаз на векторах экспрессии позволили получить эффективные продуценты внеклеточных сериновых протеиназ и внутриклеточных альдолаз. Результаты могут быть использованы при разработке стратегии синтеза ферментов промышленными штаммами бактерий. Получение гомогенных препаратов субтилизиноподобных протеиназ, глутамилэндопептидаз и альдолаз увеличивает арсенал белков, используемых в научных исследованиях и практических целях. Субтилизиноподобные протеиназы *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* обладают высокой тромболитической и антикоагулянтной активностью, что делает эти ферменты перспективными в качестве препаратов для лечения заболеваний, связанных с образованием тромбов. Субтилизиноподобные протеиназы *B.amyloliquefaciens* могут быть

использованы в синтезе специфических хромогенных субстратов для протеолитических ферментов. Полученные из рекомбинантных штаммов *E.coli* трансальдолаза и фруктозо-6-фосфат-альдолаза A129S могут быть применены для синтеза ксилулозы, являющейся предшественником в получении ксилита, широко применяющегося в промышленности.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа выполнялась в соответствии с планом НИР КГУ (№ государственной регистрации 01.2.00 104982 «Биосинтез, биогенез, классификация, физиологические функции новых микробных ферментов и возможные области их практического применения»). Научные исследования поддержаны грантами РФФИ 01-04-48037, 05-04-48182, АН РТ фонда НИОКР 03-3.10-295, 03-3.5-20, программой CRDF Rec 007, совместной программой ДААД и Минобрнауки РФ «Михаил Ломоносов» А/05/3903. Все исследования, представленные в работе, выполнены автором.

Положения, выносимые на защиту:

1. Оптимизация состава питательной среды культивирования обеспечивает высокий уровень продукции субтилизиноподобных протеиназ и глутамилэндопептидаз у природных штаммов *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus*.
2. Использование технологии клонирования генов трансальдолазы *B.subtilis* на pET 22 и фруктозо-6-фосфат-альдолазы A129S *E.coli* на векторе pJF119EH позволяет получить продуценты с высоким уровнем синтеза ферментов.
3. Выделенные ферменты обладают практически значимыми свойствами: протеиназы *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* – фибринолитической, тромболитической, антикоагулянтной активностью; субтилизиноподобные протеиназы *B.amyloliquefaciens* – пептидсинтетической активностью, трансальдолаза и фруктозо-6-фосфат- альдолаза – ксилулозо-синтетической.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на ежегодных научных конференциях молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века" (Казань, 2003–2006 г.г.) и ежегодных школах-конференциях молодых ученых “Биология – наука XXI века” (Пущино, 2003–2005 г.г.), Всероссийской научной конференции “Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии” (Казань, 2004 г.), XIII международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение», (Казань, 2005 г.), 79-ой Всероссийской студенческой научной конференции (Казань, 2005 г.). V Республиканской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Наука. Инновации. Бизнес» (Казань, 2005 г.), научном семинаре стипендиатов программы «Михаил Ломоносов» (Москва, 2006 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 27 научных работ.

Место выполнения работы и благодарности. Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского государственного университета. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю кандидату

биологических наук, доценту А.М. Мардановой за внимательное отношение к работе; кандидату биологических наук Н.П.Балабан и профессору М.Р. Шариповой – за консультации по проведению экспериментов и критические замечания. Данные по субстратной специфичности, ингибиторному анализу протеиназ, пептидному синтезу получены автором на кафедре химии природных соединений химического факультета МГУ под руководством профессора Г.Н. Руденской, за что автор выражает особую благодарность. Автор благодарит профессора Шпренгера за предоставление возможности проведения экспериментов по исследованию альдолаз на базе Института микробиологии г.Штутгарта (Германия). Автор выражает искреннюю благодарность заведующей кафедрой микробиологии Казанского университета проф. О.Н. Ильинской и сотрудникам кафедры микробиологии за помощь и теплую рабочую атмосферу.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований и обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 160 страницах машинописного текста, включает 21 таблицу, 33 рисунка. Библиография содержит 252 наименований российских и зарубежных авторов.

Материалы и методы

Штаммы и плазмиды. Штаммы, используемые в работе, приведены в табл. 1. Вектора экспрессии pET22, pWH1520, pJF119EH, а также плазмида pUC*fsa*A129S, несущая ген фруктозо-6-фосфат альдолазы A129S (с заменой аланина в позиции 129 на серин), предоставлены проф. Шпренгером, Институт микробиологии, Германия. Плазмиды pET22*tal*, pWH1520*tal*, pJF119*fsa*A129S получены в работе.

Таблица 1. Штаммы, используемые в работе

Штамм	Изменения в генотипе	Источник
B.amyloliquefaciens H2 *B.pumilus* KMM62	природные штаммы	Коллекция каф.микробиологии Казанского государственного университета
B.subtilis 168	trpC2	
E.coli DH5 α	*F-, φ80dlacZ ΔM15 (ΔlacZYA-argF)U169, deoR, recA1endA1, hsdR17 (r_k^-, m_k^+), phoA supE44, λ-, thi-1, gyrA96, relA1*	Предоставлены проф. Шпренгером, Институт микробиологии г.Штутгарта, Германия
E.coli BL (DE3) pLysS	*F-, ompT, hsdSB(r_B^-, m_B^-), gal, dcm (DE3), pLysS(Cam^R)*	

Культивирование бактерий. Исходной питательной средой для культивирования бактерий *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* являлась заводская среда (Ицкович с соавт., 1995). Пептон вносили в концентрации 15-45 г/л.

Растворы неорганического фосфата ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ – 0,1-0,4 г/л), цитрата аммония ($C_5H_7O_5COONH_4$ – 1-5мМ), хлорида аммония (NH_4Cl – 1-5мМ), стерилизовали при 1 атм и вносили в среду перед посевом. Растворы казеина, желатина, аминокислот, дрожжевого экстракта («Sigma») стерилизовали при 0,5 атм и вносили в среду до конечной концентрации 0,1-1,0%.

Штаммы *B.subtilis* 168, *E.coli* DH5α, *E.coli* (DE3) pLysS культивировали на среде LB (Sambrook et al., 1989). Для трансформации *B.subtilis* использовали среды Спицайзена (Anagnostopolous et al., 1961). При выращивании рекомбинантных штаммов *B.subtilis* и *E.coli* в среду вносили соответствующие антибиотики (эритромицин 20 мкг/мл, хлорамфеникол 50 мкг/мл, ампициллин 100 мкг/мл).

Прирост биомассы измеряли нефелометрически на КФК-2 при 590 нм. Протеолитическую активность определяли по гидролизу синтетических субстратов Z-Ala-Ala-Leu-pNA или Z-Glu-pNA (Люблинская с соавт., 1987).

Выделение плазмидной ДНК проводили методом щелочного лизиса (Sambrook et al., 1989) с помощью набора реактивов «QIAprep Spin Mini Kit» («Quagen»). Трансформацию клеток *E.coli* и *B.subtilis* плазмидной ДНК проводили как описано в работе Anagnostopolous et al., 1961.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с помощью термоциклера фирмы «Biorad» с использованием Pwo- или Taq-полимераз («Roche Applied Science») (Sambrook et al., 1989). Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 0,03-0,04 мкг плазмидной ДНК, 10-30 пкмоль каждого праймера (табл. 2), 200 мкМ смеси dNTP, 2,0 ед. полимеразы в однократном буфере («Roche Applied Science»). Рестрикцию и лигирование ДНК проводили как рекомендовано фирмой производителем («MBI fermentas»).

Определение нуклеотидной последовательности генов *tal* и *fsa*A129S в составе плазмид проводили методом терминации цепи дидезоксинуклеотидами, с помощью набора реактивов «Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit». ПЦР проводили согласно схеме, указанной производителем. Продукты реакции анализировали на автоматическом секвенаторе («Pharmacia»).

Таблица 2. Синтетические олигонуклеотиды, использованные в работе (жирным выделены сайты рестрикции – NdeI и XhoI)

Назначение праймера	Последовательность праймера
Клонирование *tal* на pET22	(1) GGAATT**CATATG**ACTCACACAGTACCTC (2) TTTT**CTCGAG**GCGATTTGGATACACCATC
Клонирование *tal* на pWH1520	(1)GG**ACTAGT**TAAATGTTATTCTTTGATACAGC (2)TCAGCGGCATTGTGCCGTATG
Секвенс pET22*tal*	TGTGAGCGGATAACAATTCCCCTC GTTATTGCTCAGCGGTGGCAGCAG
Секвенс pWH1520*tal*	CAAACTAACTCAATTAAGATAGTTGATGG CGCGTCGGATCAATTCATCGATATC
Секвенс pJF119 *fsa*A129S	GACAATTAATCATGGGCTCGTATAATGTGT CTTCTGCGTTCTGATTTAATCTG

Уровень продукции альдолаз рекомбинантными штаммами *B.subtilis* и *E.coli* оценивали следующим образом: к клеточной культуре, достигшей 0,5-0,7 ед. оптической плотности добавляли 1мМ IPTG (изопропил-β-D-тиогалактопиранозид) или 0,5% ксилозы и культивировали еще в течение 3-4, 6-7 или 12 часов. Клетки разрушали при помощи Френч-пресса и центрифугировали при 40000g. В клеточном экстракте анализировали спектр белков с помощью SDS-PAAG электрофореза (Laemmli, 1970) и определяли специфическую активность альдолаз.

Выделение и характеристика ферментов. Очистку альдолаз проводили с использованием хроматографии на Q-сефарозе и гельфильтрации на Superdex или колонке с гидроксиапатитом. Выделение и очистку протеиназ из культуральной жидкости проводили методом ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе и колонке MonoS в системе FPLC.

Свойства ферментов. Влияние ингибиторов на активность протеиназ определяли, используя DFP, PMSF, о-фенантролин, $HgCI_2$, p-CMB в молярном соотношении фермент:ингибитор 1:100. pH- и T-оптимум активности, pH- и T-стабильность протеиназ исследовали по гидролизу синтетических хромогенных субстратов Z-Ala-Ala-Leu-pNA или Z-Glu-pNA.

Субстратную специфичность субтилизиноподобных протеиназ определяли по гидролизу синтетических субстратов Glp-Ala-Ala-pNA, Glp-Ala-Phe-pNA, Z-Gly-Ala-Phe-pNA, Z-Pyr-Phe-Ala-pNA, Z-Ala-Ala-Pro-pNA; специфичность глутамилэндопептидаз определяли по гидролизу Z-Ala-Ala-Met-Glu-pNA, Z-Ala-Ala-Trp-Glu-pNA, Z-Ala-Ala-Phe-Glu-pNA, Z-Ala-Ala-Leu-Glu-pNA, Z-Ala-Ala-Trp-Asp-pNA, Z-Ala-Ala-Leu-Asp-pNA, Z-Ala-Ala-Phe-Asp-pNA, Z-Gly-Ala-Ala-Asp-pNA, Z-Glu-pNA (Люблинская с соавт., 1987).

Фибринолитическую активность протеиназ определяли на фибриновых пластинках как описано в работе Astrup et al., 1952 и выражали в ед/мг белка (1 ед = 1 $мм^2$/ч). Тромболитические и антикоагулянтные свойства протеиназ изучали *in vitro* на тромбах, образованных из цитратной плазмы крови кролика и тромбина.

Ферментативный синтез пептида Z-Ala-Ala-Leu-pNA с помощью субтилизиноподобной протеиназы *B.amyloliquefaciens* проводили из Z-Ala-Ala-OCH_3 и Leu-pNA («Sigma») в растворе диметилформамида и этилацетата.

Активность альдолаз определяли спектрофотометрически по скорости восстановления или окисления NADH (M. Shurmann et al., 2001). Синтез ксилулозы с помощью альдолаз проводили в 50мМ глицилглициновом буфере с 1мМ дитиотрейтолом, pH 8,5 с использованием различных субстратов: 1) 100 мМ фруктозо-6-фосфата и 100мМ гликольальдегида, 2) 200 мМ дигидроксиацетона и 130 мМ гликольальдегида. Реакционные смеси инкубировали при 37º и отбирали пробы через 0, 2, 12, 24 ч. Продукты реакций разделяли на колонке Aminex HPX87H («Biorad») в системе HPLC. Спектры регистрировали при 192 нм и анализировали в программе Millenium[32].

Математическую обработку полученных данных проводили в программной среде «Microsoft Excel». Результаты многофакторных экспериментов обрабатывали в программе BIOPT (Краснов с соавт., 1992).

Результаты исследований и их обсуждение

Оптимизация состава питательных сред для эффективной продукции протеиназ *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus*

Широкое использование протеиназ в различных отраслях промышленности и медицины обуславливает неослабевающий интерес к поиску новых продуцентов этих ферментов. Ранее из различных штаммов *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* были выделены и изучены субтилизиноподобные протеиназы, гены некоторых из этих ферментов секвенированы (Wells et al., 1983; Hung et al., 2003; Ayoma et al., 2000). Показано, что различные штаммы одного и того же вида бактерий могут продуцировать протеиназы, различающиеся по физико-химическим свойствам. Так, из разных штаммов *B.pumilus* выделены субтилизиноподобные протеиназы, различающиеся по pH- и T-оптимуму действия, стабильности в присутствии различных детергентов (Huang et al., 2003; Aoyama et al., 2000; Miaji et al., 2006), что может быть важным с точки зрения применения ферментов. Однако в литературе мало данных об особенностях биосинтеза, тромболитических и пептидсинтетических свойствах протеиназ бацилл.

С использованием специфических субстратов Z-Ala-Ala-Leu-pNa и Z-Glu-pNa в культуральной жидкости *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* нами идентифицированы субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза. В настоящее время арсенал продуцентов глутамилэндопептидаз невелик и немногочисленны сведения об особенностях биосинтеза этих ферментов. Исследование динамики роста культур и биосинтеза ферментов выявило, что синтез субтилизиноподобных протеиназ и глутамилэндопептидаз *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* имеет двухфазный характер (рис. 1). Протеиназы обнаруживаются в культуральной жидкости на стадии замедления роста, затем уровень активности ферментов повышается, достигая двух максимумов, соответствующих ранней и поздней стационарной

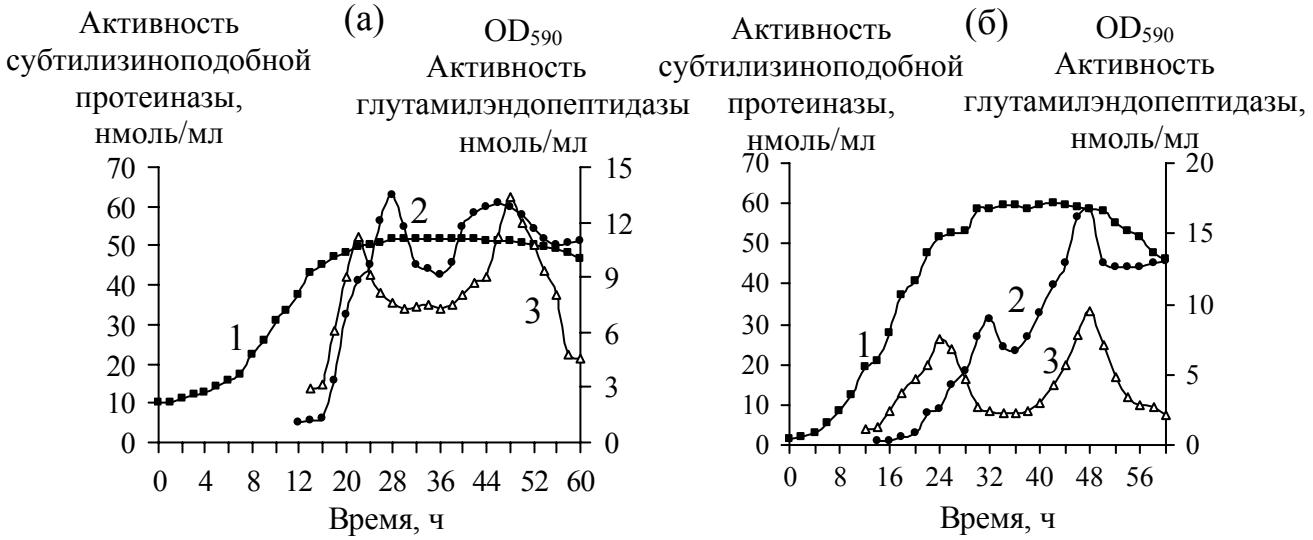

Рис. 1. Динамика роста (1), накопления субтилизиноподобной протеиназы (2) и глутамилэндопептидазы (3) *B. amyloliquefaciens* H2 (а) и *B.pumilus* КММ 62 (б).

фазе роста культур. Максимумы накопления субтилизиноподобной протеиназы *B.amyloliquefaciens* приходятся на 28 и 46-48 ч роста, а *B.pumilus* на 32-34 и 46-48 ч. Для биосинтеза глутамилэндопептидаз обеих культур также характерны два максимума накопления внеклеточной активности на 22-24 и 48 ч роста. Мы условно обозначили ферменты, соответствующие первому максимуму как субтилизиноподобная протеиназа 1 и глутамилэндопептидаза 1, ферменты, соответствующие второму максимуму – субтилизиноподобная протеиназа 2 и глутамилэндопептидаза 2. Ранее сходные закономерности биосинтеза были выявлены для сериновых протеиназ *B.intermedius* (Ицкович с соавт., 1995; Балабан с соавт., 2003). Это позволяет нам заключить, что такой характер накопления внеклеточной активности может быть связан с физиологической ролью ферментов, в частности, с их участием в процессах спорогенеза у бацилл (Errington et al., 1993; Шарипова с соавт., 2002).

С целью повышения продукции ферментов для последующего их выделения в препаративных количествах, мы подбирали состав питательной среды для эффективного синтеза протеиназ. Для определения оптимальных концентраций пептона и неорганического фосфата проводили двухфакторные эксперименты по плану В2 (Краснов с соавт., 1992). Для максимальной продукции субтилизиноподобных протеиназ 1 и 2 *B.amyloliquefaciens* концентрация пептона должна составлять 23 г/л, а неорганического фосфата – 0,24 и 0,3 г/л (рис. 2), субтилизиноподобных протеиназ 1 и 2 *B.pumilus* – пептона 35 и 26 г/л, неорганического фосфата – 0,35 и 0,32 г/л соответственно. Высокая продукция глутамилэндопептидаз 1 и 2 *B.amyloliquefaciens* наблюдается при содержании в среде 25 и 18 г/л пептона, 0,3 и 0,38 г/л неорганического фосфата соответственно. Полученные нами результаты подтверждают тот факт, что для каждого продуцента необходимо индивидуально подбирать условия эффективной продукции протеиназ (Adinarayana et al., 2002). Использование оптимизированных сред позволило повысить продукцию глутамилэндопептидаз *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* в 1,2-1,5 раз, а субтилизиноподобных протеиназ в 2-5 раз.

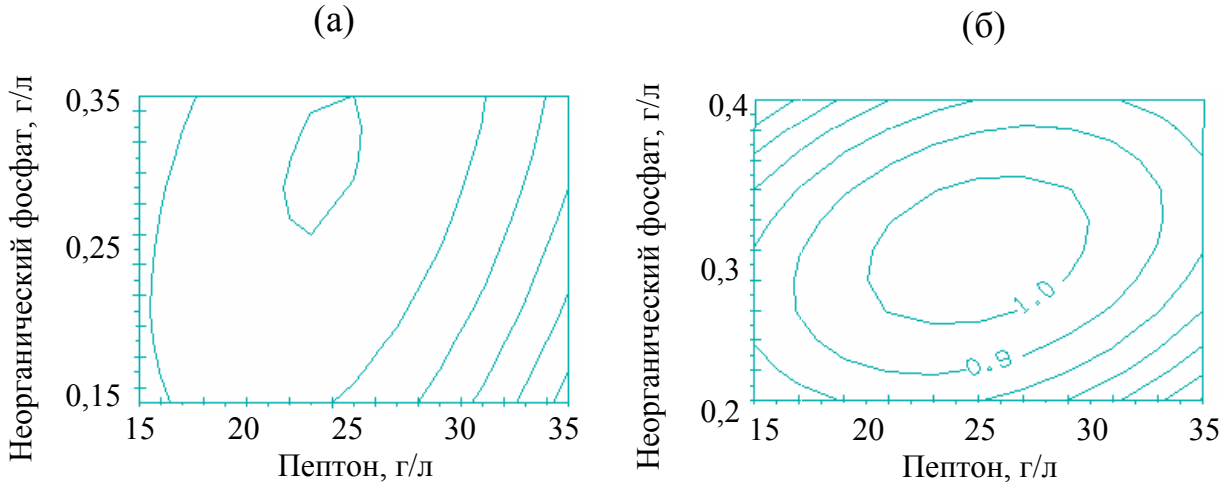

Рис. 2. Линии уровня активности в двухфакторных экспериментах для субтилизиноподобной протеиназы 1 (а) и 2 (б) *B. amyloliquefaciens.*

Известно, что наличие в питательной среде дополнительных источников азота существенно влияет на уровень продукции протеиназ. У *B.intermedius* уровень накопления глутамилэндопептидазы увеличивается при сочетании в среде органического (пептона) и неорганического (хлорид аммония) источников азота (Gabdrakhmanova et al., 1999). Мы исследовали влияние на биосинтез ферментов цитрата аммония и хлорида аммония, внесенных в среду в качестве дополнительных источников азота. Интересно, что эффект солей аммония на уровень синтеза субтилизиноподобных протеиназ *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus*, по-видимому, не зависит от природы аниона (рис. 3 а, б). Однако, уровень продукции глутамилэндопептидаз *B.amyloliquefaciens* снижается на 60% в присутствии хлорида аммония, но повышается в присутствии цитрата аммония на 60-100% (рис. 3 в, г). Соли

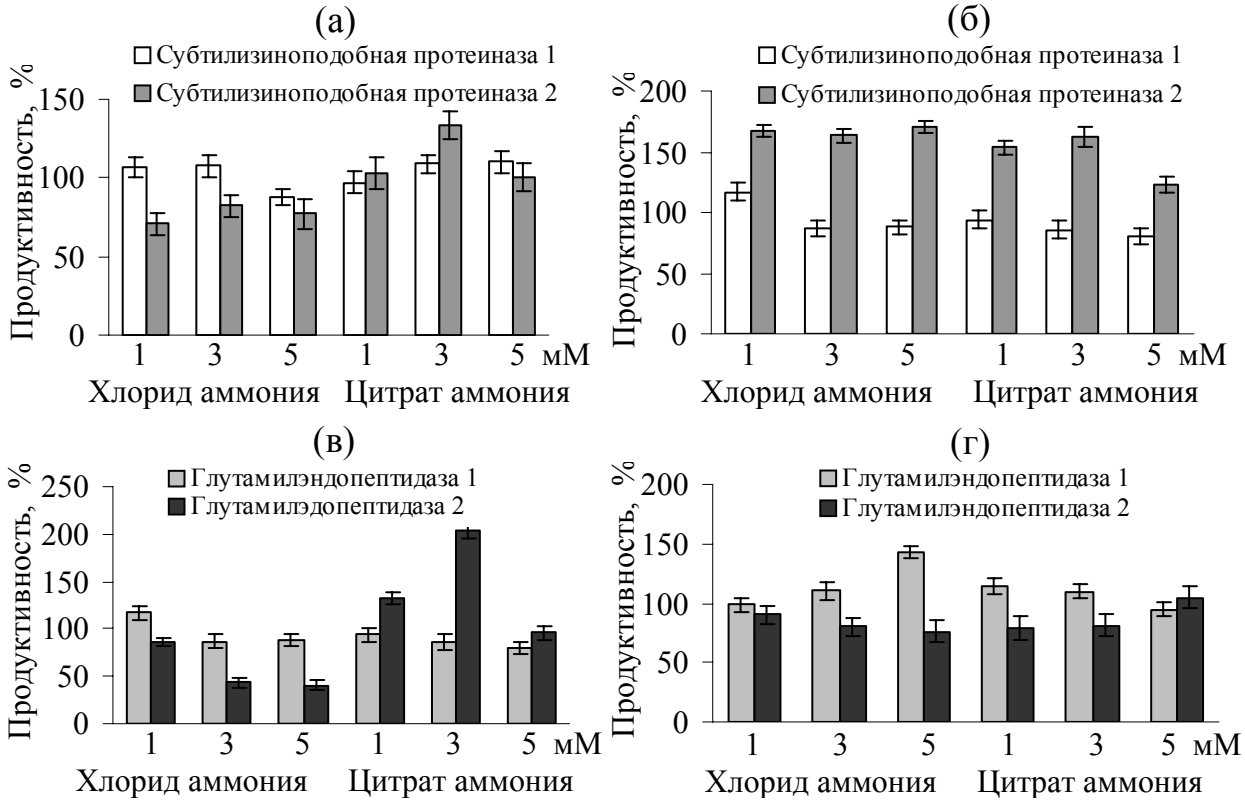

Рис. 3. Влияние солей аммония на биосинтез сериновых протеиназ *B. amyloliquefaciens* (а, в) и *B. pumilus* (б, г). За 100% принята продуктивность культуры на среде, не содержащей солей аммония.

аммония по-разному влияют на уровень накопления субтилизиноподобных протеиназ *B.pumilus* ранней и поздней стационарной фазы роста: практически не изменяют уровень синтеза протеиназы 1 и значительно стимулируют синтез протеиназы 2. Это может быть связано с тем, что на поздних стадиях развития культуры пул солей аммония, как легкометаболизируемых источников азота, исчерпан, и возникает необходимость усваивать более сложные субстраты, в том числе белки или пептиды. Для повышения продуктивности культуры целесообразно вносить в среду 5 мМ хлорида аммония, так как это увеличивает продукцию глутамилэндопептидазы 1 и субтилизиноподобной протеиназы 2 *B.pumilus* на 40-45% и 60-70% соответственно. 3-5 мМ цитрата аммония

повышают продукцию субтилизиноподобной протеиназы 2 обеих культур на 30-70% и обеих глутамилэндопептидаз *B.amyloliquefaciens* на 60-100%.

Так как протеиназы являются ферментами деградации, то они могут подвергаться индукции субстратом. Нами выявлено, что 0,5% желатин способствовал увеличению продукции глутамилэндопептидазы 2 *B.pumilus* на 30%. Однако, уровень синтеза субтилизиноподобных протеиназ обеих культур не изменялся или снижался на 70-90% в присутствии желатина и казеина. Внесение в среду дрожжевого экстракта, являющегося источником аминокислот и витаминов, по-разному влияло на продукцию субтилизиноподобных протеиназ обеих культур. Так, синтез субтилизиноподобных протеиназ *B.pumilus* интенсифицировался на среде с дрожжевым экстрактом (50-100%) (рис. 4), однако у *B.amyloliquefaciens* наблюдалась репрессия синтеза этих ферментов на 90%. По-видимому, снижение продуктивности протеиназ *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* в присутствии желатина, казеина или дрожжевого экстракта обусловлено репрессией конечными продуктами азотного метаболизма. Таким образом, включение в состав питательной среды 0,5% дрожжевого экстракта целесообразно только в случае субтилизиноподобных протеиназ и глутамилэндопептидазы 1 *B.pumilus*.

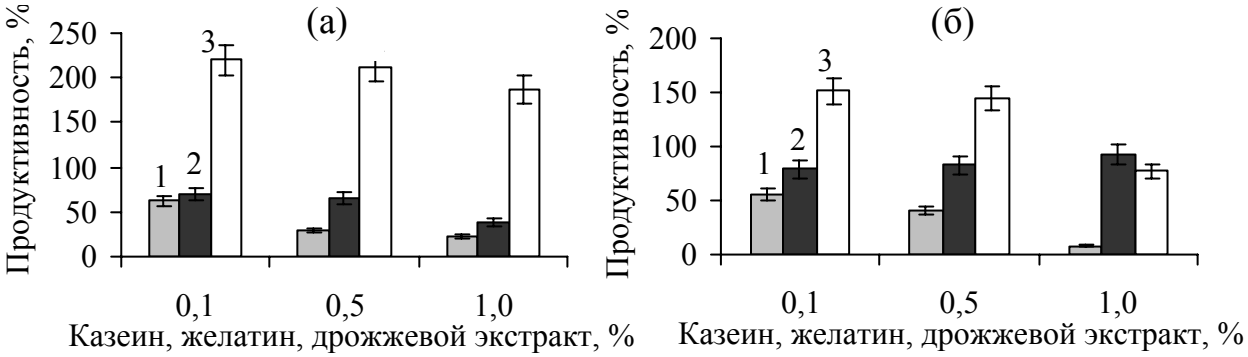

Рис. 4. Влияние казеина (1), желатина (2) и дрожжевого экстракта (3) на продукцию субтилизиноподобных протеиназ 1 (а) и 2 (б) *B.pumilus*. За 100% принята продуктивность культуры на среде без белковых субстратов.

Данные по влиянию аминокислот на продукцию субтилизиноподобных протеиназ *B.pumilus* свидетельствуют о том, что эти соединения могут как активировать, так и ингибировать синтез протеиназ. Наибольший репрессирующий эффе кт оказывали глутамин и глутамат, что, по-видимому, связано с регуляцией синтеза фермента по типу репрессии конечным продуктом. Наиболее выраженный стимулирующий эффект оказывали 0,1% лейцина и 0,1% аспарагина. Активирующее действие аминокислот на биосинтез внеклеточных протеиназ у представителей рода *Bacillus* описан и другими авторами (Calik et al., 2003).

Таким образом, влияние компонентов питательной среды на синтез того или иного внеклеточного фермента является сугубо индивидуальным и зависит как от комбинации факторов и их концентраций, так и от физиологических особенностей продуцента и стадии его развития. Полученные нами результаты

позволили разработать оптимальные питательные среды для продукции ферментов и значительно повысить выход протеиназ *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* (табл. 3).

Таблица 3. Питательные среды для эффективной продукции протеиназ *B.amyloliquefaciens и B.pumilus*

Протеиназа		Оптимальная питательная среда			Увеличение продукт-ти, %
		Пептон г/л	Неорг. фосфат, г/л	Другие компоненты	
B.amyloliquefaciens	Субтилизиноподобная протеиназа 1	23	0,24	цитрат аммония 3мМ	250
	Субтилизиноподобная протеиназа 2	23	0,3	–	250
	Глутамилэндопептидаза 1	25	0,3	цитрат аммония 3мМ	500
	Глутамилэндопептидаза 2	18	0,38	цитрат аммония 3мМ	500
B.pumilus	Субтилизиноподобная протеиназа 1	35	0,35	дрож.экстракт 5 г/л	1000
	Субтилизиноподобная протеиназа 2	26	0,32	хлорид кальция 1мМ	600
	Глутамилэндопептидаза 1	42	0,2	дрож.экстракт 5 г/л	200
	Глутамилэндопептидаза 2	45	0,4	дрож.экстракт 5 г/л	200

Получение рекомбинантных штаммов-продуцентов трансальдолазы *B.subtilis* и фруктозо-6-фосфат альдолазы *E.coli*

Альдолазы являются внутриклеточными белками и синтезируются клетками в небольшом количестве, поэтому для их препаративного получения мы использовали метод клонирования генов ферментов на векторах экспрессии. Ген трансальдолазы (*tal*) *B.subtilis* клонировали в pET 22 – векторе экспрессии для *E.coli* с регулируемым промотором T7. Поскольку известно, что экспрессия гена может интенсифицироваться при клонировании его в исходный штамм-продуцент, мы клонировали ген *tal* также в шаттл-векторе экспрессии pWH1520 с сильным промотором ксилозного оперона *Bacillus megaterium*.

Ген фруктозо-6-фосфат альдолазы *fsa* A129S *E.coli* с заменой аминокислотного остатка аланина в позиции 129 на серин был получен М.Шурманн (Институт микробиологии г.Штутгарт, Германия). Предполагается, что эта замена привела к увеличению сродства фермента к дигидроксиацетону и, как следствие, к способности эффективно катализировать реакции с участием этого субстрата. Поскольку уровень экспрессии гена, клонированного ранее на векторе pUC19, был недостаточно высоким и не позволял получать фермент в препаративных количествах, возникла

необходимость переклонирования гена *fsa*A129S на плазмиду, содержащую более сильный промотор. В качестве такого вектора нами был выбран вектор семейства pJF, содержащий гибридный промотор с –10 последовательностью lac-промотора и –35 последовательностью trp-промотора. Ген *fsa*A129S был переклонирован с вектора pUC на pJF. Результаты рестрикционного анализа полученных клонов для каждой конструкции представлены в таблице 4.

Таблица 4. Рестрикционный анализ полученных в работе плазмид

Плазмида	Рестриктазы для анализа	Фрагменты после рестрикции
pET 22 *tal*	NdeI, XhoI NdeI или XhoI	Два фрагмента – 5400 и 1000 кб Линейная молекула, 5400 кб
pWH 1520 *tal*	NdeI Spe I	Три фрагмента – 6946, 1027, 321 кб Линейная молекула, 8300 кб
pJF 119 EH *fsa*A129S	HindIII, XbaI HindIII или XbaI	Два фрагмента – 5287 и 660 кб Линейная молекула, 5950 кб

Секвенирование генов *tal* и *fsa*A129S с полученных плазмид показало идентичность их последовательностей с известными из банка данных сайта www.ncbi.nlm.nih.gov. Это указывает на то, что мы получили корректные конструкции, несущие полные гены альдолаз.

Известно, что клонирование генов не всегда сопровождается активным синтезом соответствующего целевого белка. Условия эффективной экспрессии целевого белка индивидуальны для каждой полученной рекомбинантной плазмиды. На следующем этапе работы мы исследовали экспрессию генов альдолаз в рекомбинантных штаммах *E.coli* и *B.subtilis* (рис. 5). Ген *tal* эффективно экспрессировался с вектора pET 22 в *E.coli*; удельная активность фермента в клеточном экстракте составляла 2-3 ед/мг. В рекомбинантном

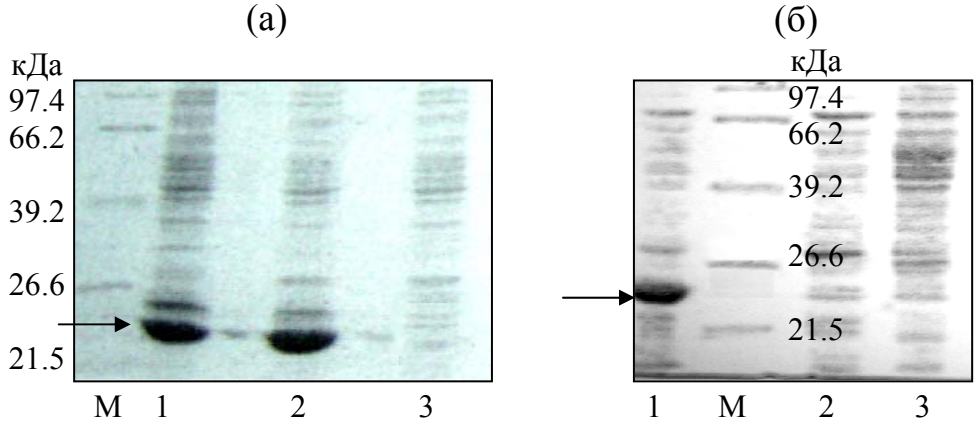

Рис. 5. SDS-PAAG электрофорез внутриклеточных белков рекомбинатных штаммов *E.coli*, несущих ген трансальдолазы (а) и фруктозо-6-фосфат-альдолазы A129S (б).
(а) 1, 2 – *E.coli* pET22*tal*; 3 - *E.coli* pET22 (негативный контроль),
(б) 1 - *E.coli* pJF*fsa*A129S; 2, 3 - *E.coli* pJF (негативный контроль).

штамме *E.coli* с pJF*fsa*A129S регистрировался высокий уровень активности фруктозо-6-фосфат альдолазы A129S (25-28 ед/мг). Однако, нам не удалось получить эффективной экспрессии гена *tal* на шаттл-векторе pWH 1520 ни в клетках *E.coli,* ни в *B.subtilis*, поэтому в дальнейшей работе эта конструкция не использовалась.

Уровень синтеза белков может зависеть от концентрации индуктора в среде, а также от времени индукции. Эффективная индукция экспрессии гена *tal* наблюдалась при внесении в среду культивирования 1 мМ IPTG, а увеличение концентрации IPTG до 5 мМ практически не меняло уровень продукции ферментов, поэтому в дальнейшем мы использовали индуктор в концентрации 1мМ. Время индукции индивидуально для каждой плазмиды (рис. 6). Для pET22 *tal* оптимальным оказалось 3-4 часа после добавления IPTG; однако через 6-8 часов индукции специфическая активность в клеточном экстракте снижалась. Для pJF119*fsa*A129S оптимальное время индукции составило 6 часов. Переклонирование гена *fsa*A129S с плазмиды pUC на pJF позволило нам увеличить уровень специфической активности в 3-4 раза.

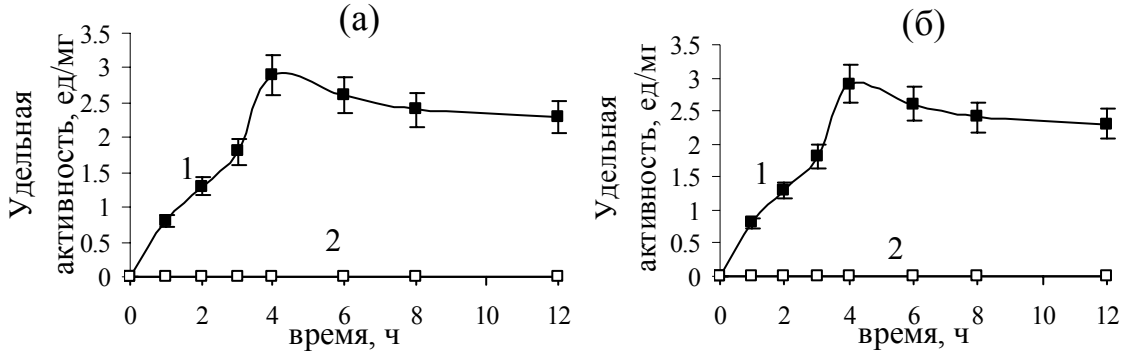

Рис. 6. Влияние продолжительности индукции на уровень экспрессии генов трансальдолазы *B.subtilis* (а) и фруктозо-6-фосфат-альдолазы A129S (б) в рекомбинантных штаммах *E.coli.*
(а)1 – *E.coli* pET22*tal*, 2 – *E.coli* pET22 (негативный контроль),
(б)1 – *E.coli* pJF*fsa*A129S, 2 – *E.coli* pJF (негативный контроль).

Таким образом, нами получены рекомбинантные штаммы *E.coli* с высоким уровнем продукции трансальдолазы *B.subtilis* и фруктозо-6-фосфат-альдолазы A129S *E.coli*.

Выделение и очистка сериновых протеиназ и альдолаз

Сериновые протеиназы ранней и поздней стационарной фазы роста выделяли из культуральной жидкости *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* с помощью ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе и хроматографии на колонке Mono-S в системе FPLC. После хроматографии на MonoS были получены две белковые фракции, которые по гидролизу синтетических хромогенных субстратов были идентифицированы как глутамилэндопептидаза и субтилизиноподобная протеиназа (рис. 7а, б). Так как в результате одностадийной высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке MonoS препараты белков были негомогенными, проводили рехроматографию в тех же условиях. За три стадии очистки получили белки со степенью очистки

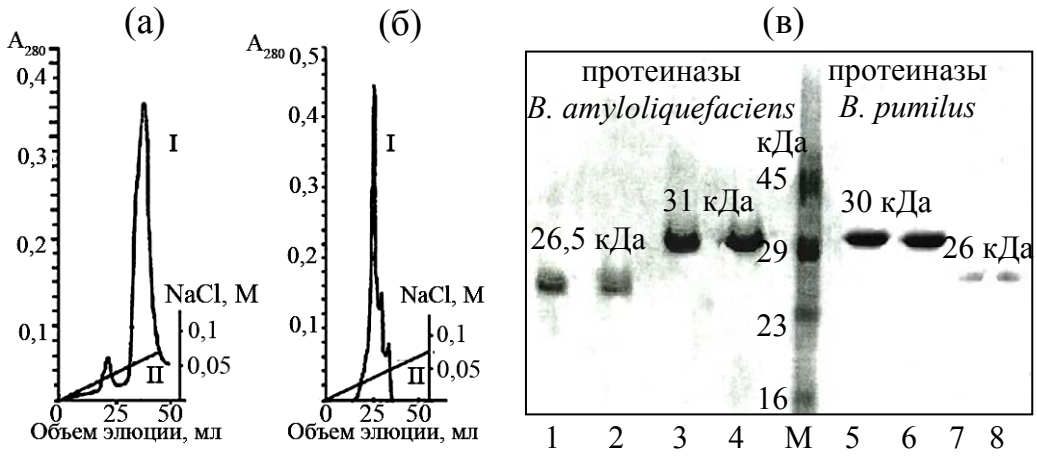

Рис. 7. Хроматографические профили субтилизиноподобной протеиназы 1 (а) и глутамилэндондопептидазы 1 (б) *B.amyloliquefaciens* на колонке Mono S и SDS-PAAG электрофорез протеиназ *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus* (в).
I - A_{280}, II – градиент NaCl (0 – 0,5M);
1, 2, 3, 4 - глутамилэндопептидазы 1 и 2, субтилизиноподобные протеиназы 1 и 2 *B.amyloliquefaciens*; 5, 6, 7, 8 – глутамилэндопептидазы 1 и 2, субтилизиноподобные протеиназы 1 и 2 *B.pumilus* соответственно.

500-800, гомогенность ферментов подтверждена электрофоретически (рис. 7 в). Молекулярные массы протеиназ, секретируемых на разных стадиях развития культуры, идентичны и равны 30 и 31 кДа для субтилизиноподобных протеиназ, 26 и 26,5 кДа для глутамилэндопептидаз *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus.*

Для выделения внутриклеточных альдолаз из рекомбинантных штаммов *E.coli* использовали метод хроматографии на Q-сефарозе в системе FPLC и последующей гельфильтрацией (в случае трансальдолазы *B.subtilis*) или хроматографии на колонке с гидроксиапатитом (для фруктозо-6-фосфат-альдолазы *E.coli*). В результате получены препараты альдолаз с выходом ферментов 60-70%. Электрофоретический анализ подтвердил гомогенность трансальдолазы (рис 8а). В результате двухстадийной очистки получен высокоочищенный препарат фруктозо-6-фосфат-альдолазы A129S (рис. 8 б).

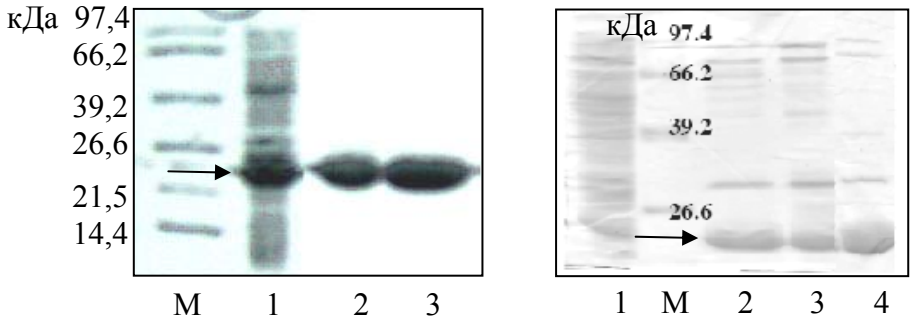

Рис. 8. SDS-PAAG электрофорез трансальдолазы *B.subtilis* (а) и фруктозо-6-фосфат-альдолазы A129S (б) из рекомбинантных штаммов *E.coli* в процессе очистки.
(а) 1 – клеточный экстракт; 2 – фракция после Q-сефарозы,
3– фракция после гель-фильтрации;
(б) 1 – клеточный экстракт; 2, 3 – фракции после Q-сефарозы,
4 – фракция после гидроксиапатита.

Характеристика сериновых протеиназ и альдолаз

С помощью специфических ингибиторов подтверждена принадлежность исследуемых ферментов *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* к классу сериновых протеиназ. Энзиматические свойства протеиназ представлены в таблице 5. pH-оптимум и pH-стабильность ферментов сходны с известными для других сериновых протеиназ. Интересно, что температурные оптимумы субтилизиноподобных протеиназ *B.amyloliquefaciens* (37°) и *B.pumilus* (30°) ниже, чем для известных субтилизинов (Peng, 2003; Huang et al., 2003).

Таблица 5. Энзиматические свойства сериновых протеиназ *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus*

Фермент	Субтилизиноподо-бные протеиназы *B.amyloliquefaciens*		Субтилизиноподо-бные протеиназы *B.pumilus*		Глутамил-эндопептидазы *B.amyloliquefaciens*	
Свойства	1	2	1	2	1	2
pH-оптимум	8,5	9,0	8,5	8,2-8,5	8,2-8,5	8,0
pH-стабильность	7,2-9,5	7,2-9,5	7,0-10,0	7,0-10,0	7,2-9,5	7,2-8,5
Температурный оптимум	37°	37°	30°	30°	45°	45°
Термо-стабильность	22-45°	22-45°	22-45°	22-45°	22-45°	22-45°

Необходимо отметить, что субтилизиноподобные протеиназы *B.pumilus* обладают протеолитической активностью даже при низких температурах, особенно протеиназа 2, которая сохраняет до 40% активности при температуре +3º. При +10-15º оба фермента сохраняют до 60-80% активности. Интересно, что сходная закономерность характерна и для сериновой протеиназы из психрофильной бактерии *Colwellia sp.* NJ341 (Wang et al., 2005). Исследуемые нами ферменты *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* не отличаются высокой термостабильностью.

Исследование субстратной специфичности субтилизиноподобных протеиназ 1 и 2 *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* показало, что ферменты не гидролизуют специфические субстраты глутамилэндопептидаз (Z-Glu-pNA) и тиоловых протеиназ (Glp-Phe-Ala-pNA). Максимальная активность наблюдается при гидролизе специфических субстратов субтилизиноподобных протеиназ – Glp-Ala-Ala-pNA, Z-Ala-Ala-Leu-pNA, где в положении P1 находится остаток Ala или Leu, причем остаток Ala играет, по-видимому, определяющую роль в процессе гидролиза, что характерно и для других субтилизиноподобных протеиназ (Люблинская с соавт., 1987, Балабан с соавт., 2004). Удельная активность субтилизиноподобных протеиназ *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* различается при гидролизе синтетических субстратов. Так, для протеиназ *B.amyloliquefaciens* остаток Phe в положении P1 (Glp-Ala-Phe-pNA) является наименее предпочтительным, тогда как протеиназа 1 *B.pumilus* в 2 раза более активна в отношении этого субстрата (табл. 6).

Таблица 6. Субстратная специфичность субтилизиноподобных протеиназ *B.amyloliquefacies* и *B.pumilus* на синтетических субстратах

Субстраты	Удельная активность, мкмоль/мл·мин·мг			
	Субтилизиноподобные протеиназы *B.amyloliquefaciens*		Субтилизиноподобные протеиназы *B.pumilus*	
	1	2	1	2
Z-Ala-Ala-Leu-pNA	11	19	0,93	0,78
Glp-Ala-Ala-pNA	31	36	1,85	4,4
Glp-Ala-Phe-pNA	0	0	0	0
Z-Pyr- Phe-Ala-pNA	0,1	0,2	0,35	0,3
Z-Gly-Ala-Phe-pNA	0	0	0,13	0,04
Z-Ala-Ala-Pro-pNA	0	0	0,033	0,01

Исследование субстратной специфичности глутамилэндопептидаз 1 и 2 *B.amyloliquefaciens* свидетельствует о том, что эти ферменты проявляют предпочтение к связям, образованным глутаминовой, а не аспарагиновой кислотой, что характерно для ферментов этой группы (Nienaber et al., 1993; Leshchinskaya et al., 1997) (табл. 7).

Таблица 7. Субстратная специфичность глутамилэндопептидаз *B. amyloliquefaciens* на синтетических субстратах

Субстрат	Удельная активность мкмоль/мл·мин·мг	
	Глутамил-эндопептидаза 1	Глутамил-эндопептидаза 2
Z-Ala-Ala-Met-Glu-pNA	4,8971	10,338
Z-Ala-Ala-Trp-Glu-pNA	3,0882	3,9054
Z-Ala-Ala-Phe-Glu-pNA	8,9779	17,243
Z-Ala-Ala-Leu-Glu-pNA	11,753	20,095
Z-Ala-Ala-Glu-pNA	3,2	7,05
Z-Glu-pNA	0,7647	1,1081
Z-Ala-Ala-Trp-Asp-pNA	0,2176	0,2162
Z-Ala-Ala-Leu-Asp-pNA	0,1471	0,1216
Z-Ala-Ala-Phe-Asp-pNA	0,0897	0,0757
Z-Gly-Ala-Ala-Asp-pNA	0,3235	0,4054

В связи с распространением заболеваний, связанных с тромбообразованием, в настоящее время проводится активный поиск ферментов, способных эффективно лизировать тромбы. Мы исследовали фибринолитические, тромболитические и антикоагулянтные свойства протеиназ *B.amyloliquefaciens* H2 и *B.pumilus* КММ 62. Субтилизиноподобные протеиназы *B.amyloliquefaciens* обладают высокой фибринолитической активностью в сравнении с другими известными ферментами (рис. 9 а). Интересно, что узкоспецифичные глутамилэндопептидазы *B.amyloliquefaciens* также лизируют фибрин (128 и 104 ед/мг).

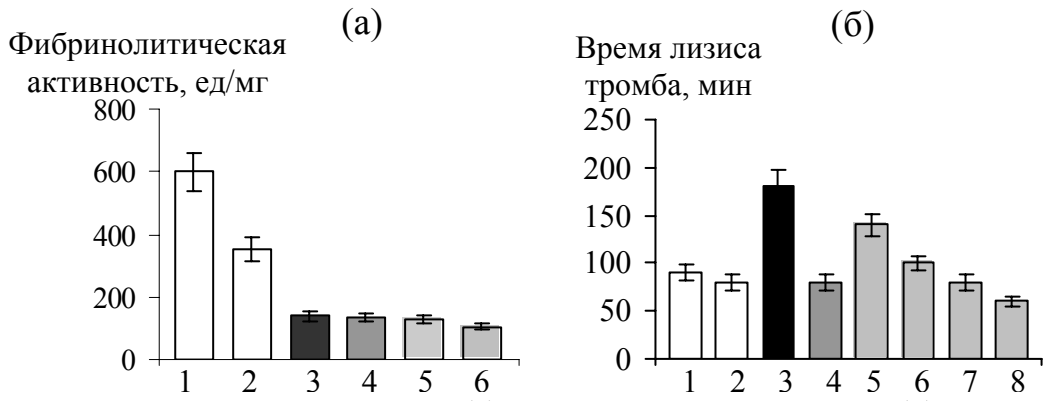

Рис. 9. Фибринолитическая (а) и тромболитическая (б) активность сериновых протеиназ.

1, 2 – субтилизиноподобная протеиназа 1 и 2 *B.amyloliquefaciens,*

3 – субтилизиноподобная протеиназа 1 *B.intermedius,*

4 – протеиназа *Thermoactinomyces vulgaris,*

5, 6 – глутамилэндопептидазы 1 и 2 *B.amyloliquefaciens,*

7, 8 – субтилзиноподобные протеиназы 1 и 2 *B.pumilus.*

Исследование тромболитических свойств протеиназ *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* показало, что все исследуемые протеиназы в высоких концентрациях (1 мг/мл) эффективно лизировали тромб, при этом наибольшей активностью обладали субтилизиноподобные протеиназы *B.pumilus* (1 ч 20 мин и 1 ч), а наименьшей – глутамилэндопептидазы *B.amyloliquefaciens* (3 ч и 4,5 ч) (рис. 9б). Следует отметить, что тромболитическая активность исследуемых протеиназ сравнима с активностью известных ферментов *Th.vulgaris* и *B.intermedius* (Лютова с соавт., 1990; Ицкович с соавт., 1997). Протеиназы *B.pumilus* лизируют тромб в низких концентрациях (25-100 мкг/мл), что важно с точки зрения минимизации побочных токсических эффектов. Все исследованные протеиназы в концентрации 0,5-1мг/мл обладали выраженными антикоагулянтными свойствами, сопоставимыми с таковыми для субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* (Ицкович, 1997). Полученные данные указывают на перспективность применения протеиназ *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* в качестве тромболитических препаратов.

Использование протеиназ в качестве катализаторов образования пептидной связи является приоритетным направлением современной химии пептидов. Преимуществами синтеза с участием протеиназ является отсутствие рацемации, возможность работы с минимальным числом защитных группировок, высокая скорость протекания реакций. На примере образования пептида Z-Ala-Ala-Leu-pNA из Z-Ala-Ala-OCH3 и Leu-pNA в настоящей работе впервые показано, что субтилизиноподобные протеиназы *B.amyloliquefaciens* способны катализировать синтез пептидных связей с высоким выходом конечного продукта (45%). Полученный трипептид является специфическим хромогенным субстратом субтилизиноподобных протеиназ и широко применяется для идентификации протеолитических ферментов.

Подобно протеиназам, альдолазы также способны катализировать как прямую, так и обратную реакцию конденсации. Эти ферменты могут как расщеплять, так и синтезировать С–С связи, что позволяет использовать их в

синтезе ряда сахаров-предшественников промышленно важных соединений. Так, продукт альдозной реакции – ксилулоза – применяется в получении ксилита или ксилозы (антифунгицидный препарат) (Kwon et al., 2005; Lu et al., 2003; Takahata et al., 2003). Получение ксилулозы из недорогих субстратов является важной биотехнологической проблемой, которая может быть решена благодаря использованию бактериальных альдолаз с разной субстратной специфичностью.

Ранее для трансальдолазы В из *E.coli* показано, что этот фермент способен синтезировать кето-сахара из фруктозо-6-фосфата и формальдегида. Поскольку трансальдолазы обладают сходной специфичностью, нами была исследована способность трансальдолазы *B.subtilis*, выделенной из рекомбинантных клеток *E.coli*, к синтезу сахаров, в частности, ксилулозы. С использованием метода HPLC, нами было показано, что трансальдолаза *B.subtilis* эффективно катализирует синтез ксилулозы из фруктозо-6-фосфата и гликольальдегида с выходом продукта не менее 60% (рис. 10).

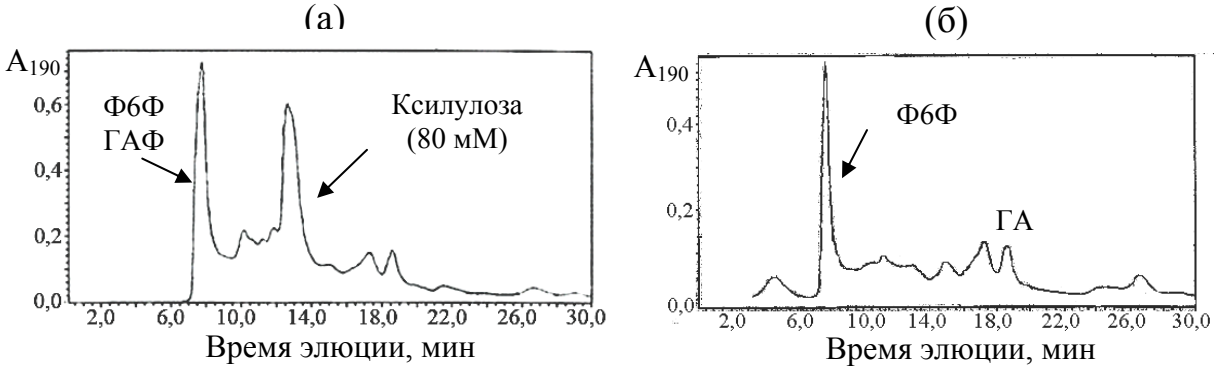

Рис. 10. Хроматографические профили реакционной смеси, содержащей фруктозо-6-фосфат (Ф6Ф) и гликольальдегид (ГА), через 24 ч после инициации реакции (в системе HPLC) (ГАФ – побочный продукт реакции глицеральдегидфосфат).
(а) - в присутствии трансальдолазы *B.subtilis*,
(б) - в отсутствие трансальдолазы *B.subtilis* (негативный контроль).

Однако используемые в этой реакции фруктозо-6-фосфат и гликольальдегид характеризуются высокой стоимостью. При масштабировании процесса для достижения экономической рентабельности производства необходимо использовать недорогие субстраты. Поэтому в качестве субстратов для синтеза ксилулозы мы взяли дигидроксиацетон и гликольальдегид. Анализ продуктов после окончания реакции (через 24 ч) выявил низкую эффективность синтеза ксилулозы, конечная концентрация которой составляла 8 мМ. Это позволяет нам сделать вывод о низком сродстве трансальдолазы *B.subtilis* к дигидроксиацетону.

Ранее в лаборатории проф. Шпренгера доктором М.Шурманн (Институт микробиологии, г. Штутгарт, Германия) была получена мутантная форма фруктозо-6-фосфат-альдолазы с аминокислотной заменой в A129S в активном центре. Предполагалось, что эта замена может привести к увеличению сродства фермента к дешевому дигидроксиацетону. Для выяснения этого вопроса мы

исследовали способность этого фермента к синтезу ксилулозы из дигидроксиацетона и гликольальдегида. Нами показано, что фруктозо-6-фосфат- альдолаза A129S гораздо эффективнее катализировала эту реакцию, нежели неизмененный фермент дикого типа. При участии белка с мутацией удалось получить 95 мМ ксилулозы, тогда как в тех же условиях с помощью неизмененной фруктозо-6-фосфат-альдолазы синтезировалось всего 10 мМ продукта (рис. 11).

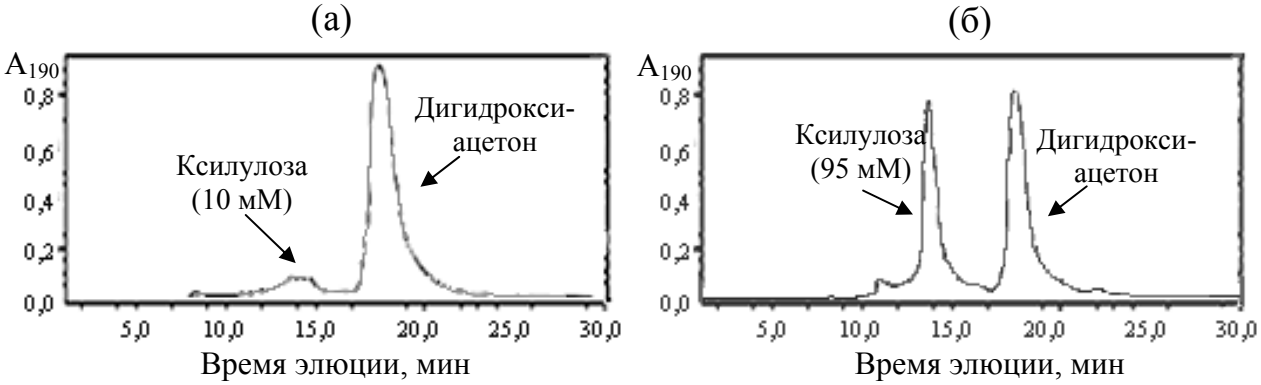

Рис. 11. Хроматографические профили реакционной смеси, содержащей дигидроксиацетон и гликольальдегид, через 24 ч после инициации реакции (в системе HPLC).
(а) – в присутствии фруктозо-6-фосфат-альдолазы WT (дикого типа) *E.coli*,
(б) – в присутствии фруктозо-6-фосфат-альдолазы A129S *E. coli*.

Итак, фруктозо-6-фосфат-альдолаза A129S является эффективным катализатором синтеза ксилулозы и способна использовать дигидроксиацетон в отличие от фруктозо-6-фосфат-альдолазы.

Таким образом, использование различных подходов для повышения биосинтетической активности штаммов-продуцентов позволило нам получить внеклеточные сериновые протеиназы бацилл и внутриклеточные альдолазы из рекомбинантных штаммов *E.coli* в препаративных количествах и изучить их свойства. Показано, что исследуемые ферменты обладают рядом практически важных свойств, что делает их перспективными для использования в различных областях. Так, благодаря узкой субстратной специфичности, глутамилэндопептидазы *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* могут быть применены для секвенса белков и пептидов. Высокая тромболитическая активность субтилизиноподобных протеиназ определяет возможность использования этих ферментов в качестве тромболитических препаратов. Полученные нами результаты по исследованию ксилулозосинтетической активности альдолаз показали, что фруктозо-6-фосфат-альдолаза A129S *E.coli* является более эффективным катализатором синтеза ксилулозы из недорогих субстратов, что может быть принципиально важным при крупномасштабном производстве кето-сахаров.

Выводы

1. Бактерии *B.amyloliquefaciens* H2 и *B.pumilus* KMM62 секретируют в культуральную среду субтилизиноподобные протеиназы и глутамилэндопептидазы с двумя максимумами накопления активности в раннюю и позднюю стационарную фазу роста. Подобран состав питательной среды, обеспечивающий высокий уровень активности протеиназ в культуральной жидкости на разных стадих роста.
2. Получены рекомбинантные штаммы *E.coli* BL21(DE3) pLysS pET22*tal* и *E.coli* DH5α pJF119*fsa* с высоким уровнем продукции альдолаз. Подобраны условия для эффективной экспрессии соответствующих генов.
3. Из культуральной жидкости *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* получены сериновые протеиназы в гомогенном состоянии со степенью очистки 500-800. Из рекомбинантных клеток *E.coli* выделены трансальдолаза в гомогенном состоянии и высокоочищенный препарат фруктозо-6-фосфат-альдолазы A129S со степенью очистки 5-6 и выходом 60-70%.
4. Показано, что исследуемые ферменты *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus* по типу ингибирования относятся к классу сериновых протеиназ. Определены энзиматические свойства и субстратная специфичность протеиназ *B.amyloliquefaciens* и *B.pumilus*. Ферменты обладают высокой фибринолитической, тромболитической и антикоагулянтной активностью. Субтилизиноподобные протеиназы *B.amyloliquefaciens* обладают пептидсинтетической активностью.
5. Показана способность альдолаз к образованию ценного в практическом отношении сахара ксилулозы из различных субстратов. Установлено, что при синтезе ксилулозы из дигидроксиацетона и гликольальдегида с применением фруктозо-6-фосфат-альдолазы A129S выход конечного продукта в 10 раз выше, чем при использовании нативного фермента.

Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Balaban N.P. Selection of cultivation medium for production of late phase serine proteinases from *B.intermedius* / N.P. Balaban, L.A. Gabdrahkmanova, M.R. Sharipova, A.M. Mardanova, E.A. Sokolova, **L.A**. **Malikova**, I.B. Leshchinskaya // J. Basic Microbiol. – 2004. – V. 44. – № 6. – P. 415-423.
2. Балабан Н.П. Получение и характеристика субтилизиноподобных протеиназ, секретируемых в стационарную фазу роста *Bacillus amyloliquefaciens* H2. / Н.П. Балабан**, Л.А. Маликова,** А.М. Марданова, Г.Н. Руденская, М.Р. Шарипова // Биохимия – 2007. – Т. 72. – Вып. 4. – С. 568-575.
3. **Маликова Л.А.** Условия биосинтеза внеклеточной субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* KMM62. / Л.А. Маликова, А.М. Марданова, О.В. Соколова, Н.П. Балабан, Г.Н. Руденская, М.Р. Шарипова // Микробиология – 2007. – Т. 76. – Вып. 3. – С. 1-8.
4. **Маликова Л.А**. 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 // Ученые записки Казанского государственного университета, сер. «Естественные науки» – 2006. – Т. 148. – Кн. 2. – С. 90-101.
5. **Маликова Л.А**. 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 // Ученые записки Казанского государственного университета, сер. «Естественные науки» – 2007. – Т. 49. – Кн. 1. – С. 102-112.
6. Михайлова Е.О. Влияние d_1 – факторов на рост культуры и продукцию субтилизина рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* / Е.О. Михайлова, **Л.А**. **Маликова**, Н.В. Феоктистова, А.М. Марданова // Сборник статей «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». – Казань, 2004. – С. 82-85.
7. Михайлова Е.О. Биосинтез субтилизиноподобных протеиназ *Bacillus pumilus KMM 62* / Е.О. Михайлова, **Л.А**. **Маликова**, А.Р. Сабирова, А.М. Марданова // Сборник статей «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». – Казань, 2004. – С. 121-124.
8. **Маликова Л.А.** Биосинтез субтилизинодобных протеиназ *Bacillus amyloliquefaciens* / Л.А. Маликова, А.М. Яхъяев, Н.П. Балабан // Сборник тезисов 7-й международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2003. – С. 65.
9. **Маликова Л.А**., Влияние компонентов питательной среды на накопление субтилизинов в культуральной жидкости *Bacillus amyloliquefaciens* / Л.А. Маликова, Н.П. Балабан // Тезисы докладов III

конференции научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века". – Казань, 2003. – С. 54.
10. Шамсутдинов Т.Р. Выделение и характеристика субтилизинов *Bacillus amyloliquefaciens* / Т.Р. Шамсутдинов, **Л.А. Маликова**, Н.П. Балабан // Тезисы докладов IV конференции научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века". – Казань, 2004. – С. 84.
11. Тимофеева Т.А. Субтилизины *Bacillus pumilus* / Т.А. Тимофеева, Е.О. Михайлова, О.М. Суетина, **Л.А. Маликова** // Тезисы докладов IV конференции научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века". – Казань, 2004. – С. 80.
12. **Маликова Л.А.** Выделение и характеристика внеклеточных сериновых протеиназ *Bacillus amyloliquefaciens* / Л.А. Маликова, Т.Р. Шамсутдинов, А.М. Марданова, Н.П. Балабан // Материалы XI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов–2004". – Москва, 2004. – С. 28.
13. **Маликова Л.А.** Сериновые протеиназы *Bacillus amyloliquefaciens* / Л.А. Маликова, Н.П. Балабан // Материалы XLII международной научной студенческой конференции “Студент и научно-технический прогресс”. – Новосибирск, 2004. – С. 37-38.
14. Михайлова Е.О. Сериновые протеиназы *Bacillus pumilus* / Е.О. Михайлова, О.М. Суетина, **Л.А. Маликова** // Материалы XLII международной научной студенческой конференции “Студент и научно-технический прогресс”. – Новосибирск, 2004. – С. 22-23.
15. **Маликова Л.А.** Субтилизины *Bacillus amyloliquefaciens* / Л.А. Маликова, Н.П. Балабан // Материалы 8-й международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2004. – С. 45.
16. **Маликова Л.А**. Оптимизация синтеза, получение и характеристика субтилизинов, продуцируемых на разных фазах роста *Bacillus amyloliquefaciens* / Л.А. Маликова, Т.Р. Шамсутдинов, Н.П. Балабан, А.М. Марданова, М.Р. Шарипова // Материалы конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». – Казань, 2004. – С. 53-54.
17. **Маликова Л.А** Субтилизиноподобные протеиназы *Bacillus amyloliquefaciens* / Л.А. Маликова, Т.Р. Шамсутдинов, Г.Н. Руденская, А.М. Марданова, Н.П. Балабан // Материалы XIII международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение». – Казань, 2005. – С. 55-56.
18. **Маликова Л.А.** Сериновые протеиназы *Bacillus pumilus*, секретируемые в позднюю стационарную фазу роста / Л.А**.** Маликова, О.В. Соколова, А.М. Марданова, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова // Материалы XIII международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение». – Казань, 2005. – С. 57-58.
19. Соколова О.В. Субтилизиноподобная протеиназа *Bacillus pumilus*, секретируемая в позднюю стационарную фазу роста. / О.В. Соколова,

Л.А. Маликова, А.М. Марданова // Тезисы докладов V конференции научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века". – Казань, 2005. – С. 80.
20. Соколова О.В. Влияние экзогенных факторов на биосинтез субтилизина *Bacillus pumilus.* / О.В. Соколова, **Л.А. Маликова**, Т.А. Тимофеева, А.М. Марданова // Тезисы докладов V конференции научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века". – Казань, 2005. – С. 86.
21. **Маликова Л.А.** Тромболитические и антикоагулянтные свойства сериновой протеиназы, секретируемой *Bacillus amyloliquefaciens in vitro*. / Л.А. Маликова, Г.Н. Руденская, Л.В. Лютова, А.М. Марданова // Сборник тезисов докладов 79-ой Всероссийской студенческой научной конференции. – Казань, 2005. – С. 109.
22. **Маликова Л.А.** Особенности контроля биосинтеза субтилизинов, секретируемых *Bacillus pumilus* КММ 62 / Л.А. Маликова, Т.Р. Шамсутдинов, О.В. Соколова, А.М. Марданова // Материалы 9-й международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2005. – С. 201.
23. Соколова О.В., Подбор питательной среды для эффективной продукции протеиназ, секретируемых *Bacillus pumilus* КММ 62. / О.В. Соколова, Т.С. Тимофеева, **Л.А. Маликова**, А.М. Марданова // Материалы 9-й международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2005. – С. 213.
24. Соколова О.В. Влияние экзогенных факторов на биосинтез субтилизина *Bacillus pumilus* / О.В. Соколова, **Л.А. Маликова**, А.М. Марданова // Тезисы докладов V конференции научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века". – Казань, 2005. – С. 80.
25. **Маликова Л.А.** Антикоагулянтная и тромболитическая активности субтилизиноподобных протеиназ, секретируемых *Bacillus pumilus* КММ 62. / Л.А. Маликова, О.В. Соколова, А.М. Марданова, Н.П. Балабан // Материалы V Республиканской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Наука. Инновации. Бизнес». – Казань, 2005. – С. 79.
26. **Маликова Л.А.** Очистка, характеристика и тромболитические свойства субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* КММ 62 / Л.А. Маликова, О.В. Соколова, А.М. Марданова // Тезисы докладов VI конференции научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века". – Казань, 2006. – С. 103.
27. **Маликова Л.А.** Создание генетических конструкций, обеспечивающих суперпродукцию бактериальных ферментов с практически ценными свойствами. / Л.А. Маликова, Г.А. Шпренгер // Сборник материалов научного семинара стипендиатов программы Михаил Ломоносов 2005/06 года. – Москва, 2006. – С. 122-125.