

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК. 579.22

### ОСОБЕННОСТИ ПРОДУЦИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ БАКТЕРИЕЙ *BACILLUS SUBTILLIS*

© В.С. Аникеева

*Аннотация.* Рассмотрены механизмы образования ферментов у отдельных представителей рода *Bacillus*. Установлена зависимость образования фермента от состава питательной среды и фазы роста культуры. Было показано, что в позднюю стационарную фазу продуцируется большее количество фермента, чем в раннюю стационарную фазу. Важное значение в выработке фермента играет состав питательной среды, например, глюкоза способствует катабитной репрессии гена, ответственного за выработку ферментов, а небольшое количество сахарозы, напротив, увеличивает синтез.

*Ключевые слова:* бактериальные ферменты, *Bacillus subtilis*, субтилизиноподобная протеиназа, глутамилэндопептидаза

*Bacillus subtilis* является грамотрицательной бактерией, которая выделяет большое количество внеклеточных ферментов, при этом не выделяя в среду токсичных метаболитов. Получила широкое распространение в различных отраслях промышленности, таких как ветеринария, медицина, и ряде других отраслей [1]. 65 % протеаз представляют собою технические ферменты, используемые при производстве крахмала, текстиля, детергентов и т. д., также получили распространение в пищевой промышленности (хлебопекарном производстве, винном, мясной, молочной промышленности), небольшая часть ферментов используется при производстве кормов для животных. По сравнению с ферментами животного происхождения микробные ферменты более легки в производстве, меньшие финансовые затраты и простота утилизации отходов, а также данные ферменты обладают более высокими показателями активности [2]. Наиболее изученной группой продуцируемых ферментов бактериями рода *Bacillus* являются сериновые протеиназы [3].

Род *Bacillus* обладает широкими адаптивными возможностями, так как способны реализовывать различные варианты ответа на изменение окружающих условий и регуляции метаболизма. К ним относятся поглощение экзогенной ДНК, продуцирование протеолитических белков, спорообразование и ряд других. В основе адаптационного ответа бакте-

рий лежит механизм сигнальной трансдукции. Так, при истощении в среде определенных питательных веществ включаются пары генов, отвечающих за выработку ферментов деградации (DegS-DegU), состояния компетентности (ComP-ComA), синтеза ферментов фосфорного обмена, при недостатке органического фосфора (PhoP-PhoR), за переход к спорообразованию отвечает пара генов SpoO-SpoA [4–5]. Одним из адаптационных механизмов является выработка ферментов в окружающую среду, что способствует возможности расширения питательных субстратов, потребляемых бактериями.

Субтилизиноподобные сериновые протеиназы относятся к семейству субтилаз, выделяют внеклеточные и внутриклеточные, многие обладают третичной структурой. Данные ферменты широко распространены в природе, что обусловлено их участием во многих физиологических процессах. Бактериальные субтилазы обладают стабильностью при высоких значениях pH, широкой субстратной специфичностью и активны при высоких температурах. Ферменты синтезируются внутриклеточно в виде предшественников – препроферментов, в их состав входит сигнальный пептид, пропептид и зрелый фермент [6–7]. Фермент активно синтезируется при переходе культуры в стационарную фазу и достигает максимума при переходе к замедленному росту [8].

Глутамилэндопептидазы относятся к семейству химотрипсина подсемейства сериновых протеиназ. Они обладают узкой специфичностью и участвуют в расщеплении связей между карбоксильными группами аминокислот [9]. Данное семейство протеаз имеют общий принцип пространственной организации – химотрипсиновый фолд [10].

Данные ферменты нашли применение как «инструменты» при исследовании первичной структуры белковых молекул и их фрагментации, являются моделями для создания белков с заданными свойствами. Фермент довольно устойчив к действию ингибиторов, возможно подавление активности ингибитором диизопропилфторфосфатом (DFP) и фенилметилсульфонилфторидом (PMSF), при это устойчив к бензамидину, ЭДТА и белковым ингибиторам.

Субтилизиноподобная протеиназа так же ингибируется, как и глутамилэндопептидаза DFP и PMSF, при этом устойчива к ЭДТА, офенантролину и ТЛСК, белковые ингибиторы оказывают различное влияние на протеиназы [11].

При этом можно отметить, что ингибирование активности ферментов на разных фазах роста одними и теми же ингибиторами проявляется по-разному. Так, действие ранней глутамилэндопептидазы подавляется лишь на 15 % фенилметилсульфонилфторидом, а позднее подавление на 30 %. Имидазол, бензамидин и белковые ингибиторы не ингибируют

активность фермента в вегетативную фазу роста, но при этом снижают активность более позднего фермента. Предполагают, что данные различия связаны с разным конформационным статусом белка на разных фазах роста [12].

Поздняя глутамилэндопептидаза и субтилизиноподобная протеиназа характеризуются более высокой активностью в сравнении с ранними ферментами, что позволяет им активнее связывать и расщеплять субстраты. Предполагают, что также это может быть связано с участием поздних протеолитических ферментов в участие спорообразования.

Оптимальным значением для активности ферментов составляет pH 7,2–9,5. Температурный оптимум для глутамилэндопептидазы лежит в диапазоне 37–50 °С, а для субтилизиноподобной протеиназы – 22–45 °С. Изменение температурных оптимумов возможно при внесении в среду ионов двухвалентного кальция [11].

Рядом исследователей было установлено, что при изменении условий культивирования происходит изменение выхода фермента. Изменение состава питательной среды, в которой происходит культивирование бактерий, способно изменять количество продуцируемого фермента. Также было показано, что изменение синтеза ферментов происходит на разных стадиях роста культуры. Так как микроорганизмы постоянно сталкиваются с неблагоприятными условиями среды, такими как недостаток питательных веществ, повышенные или пониженные температуры, изменение pH среды и т. п., им необходимо постоянно адаптироваться к изменяющимся условиям [13].

Бактерии, входящие в род *Bacillus*, в качестве адаптационного ответа к изменяющимся условиям среды продуцируют большое количество ферментов для расширения питательных субстратов, различные антибиотики и т. д. [14]. Есть предположения, что синтез внеклеточных протеиназ в стационарную фазу роста является одной из реакции адаптации к изменяющимся условиям среды. Именно в стационарную фазу роста происходит активный синтез вторичных метаболитов [3].

Синтез сериновых протеиназ в стационарной фазе имеет важное значение для адаптации микроорганизмов и процессах спорообразования. Так, у бактерий *B. Subtilis* они принимают участие в синтезе спорных оболочек и прорастании спор [11].

Присутствие азота в среде необходимо для многих процессов, осуществляемых живыми организмами. Для бактерий *Bacillus subtilis* оптимальным источником азота является аммоний. В условиях недостатка азота происходит повышение экспрессии генов, отвечающих за переработку вторичных источников азота. В условиях азотного голодания бактерии *B. Subtilis* способны использовать в качестве источника азота нук-

леиновые кислоты. Так, в условиях дефицита азота происходит активация генов, отвечающих за синтез биназ и РНКаз (гуанилспецифичные рибонуклеазы), вследствие чего происходит повышение синтеза соответствующих ферментов [15].

В условиях нехватки азота происходит частичное снятие катаболитной репрессии генов, ответственных за переработку альтернативных источников азота. Образуется комплекс источника азота на клеточной мембране и происходит транспорт вещества внутрь клетки за счет белка NrgA. На среде, содержащей аммоний, происходит регуляция экспрессии гена *argV* системой катаболитной репрессии, и вследствие этого происходит снижение синтеза протеиназы, тогда как на среде, содержащей хлорид аммония, содержание фермента было выше в 3–4 раза. При этом синтез глутаминэндопептидазы не зависит от азотного источника питания, и как следствие можно сделать вывод, что репрессия гена *gseV* не зависит от источника азота [16].

Так, в работе Л. Габдрахмановой с соавт. было показано, что увеличение количества вырабатываемого фермента глутаминэндопептидазы возможно за счет внесения в питательную среду оптимального соотношения пептона и неорганического фосфора. Было показано, что внесение в среду сложных белковых компонентов позволяет увеличить выход фермента, в то время как внесение простых углеводных источников, напротив, приводит к снижению синтеза фермента [17].

Было доказано, что в условиях фосфатного голодания рекомбинантный штамм *Bacillus subtilis* полноценной или дефектной регуляторной системой способен активно продуцировать гуанилспецифичные рибонуклеазы. Выработка фермента регулируется на уровне транскрипции белками системы трансдукции сигнала PhoP-PhoR, который контролирует экспрессию генов РНО. В работе В.В. Ульяновой с соавт. было показано, что в штаммах бактерии с дефектным геном *SpoOA* выделяется большее количество фермента, в отличие от штамма без дефектного гена, и составляет в 6 раз больше [18].

Также было установлено стимулирующие действие некоторых ионов металлов. Присутствие в среде двухвалентных ионов металлов оказывает стабилизирующее действие на глутаминэндопептидазу и приводит к увеличению ее активности и повышению биосинтеза. Такой положительный эффект оказывают ионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Co}^{2+}$ . При внесении в питательную среду ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  возможно увеличение выхода фермента на 10–30 % в поздней стационарной фазе роста культуры [11]. Ионы  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , напротив, оказывают ингибирующее действие, что приводит к снижению продуктивности до 30 %.

Внесение в среду оптимального количества казеина, желатина, дрожжевых экстрактов способствует увеличению выхода фермента субтилизиноподобной протеиназы в ранней стационарной фазе роста и незначительному увеличению в поздней стационарной фазе. Было установлено, что выход глутамилэндопептидазы на поздних стадиях развития так же стимулируется, как и в более ранних стадиях [9; 14].

Известно репрессирующее действие легкоусвояемых сахаров на экспрессию генасериновых протеиназ, в результате внесения в состав среды глюкозы наблюдается рост бактериальной культуры и снижение выхода фермента. При внесении в среду 0,5 % сахарозы, напротив, оказывало незначительный стимулирующий эффект.

Внесение в состав питательной среды следующих аминокислот: цистеина, гистидина, аспарагина, триптофана, глутамина, глутамата, способствует увеличению выхода протеиназ. Лейцин приводит к увеличению синтеза раннего фермента [14]. Валин, лейцин, аланин и аспарат не показали эффективности или приводили к незначительному ингибированию синтеза субтилизиноподобной сериновой протеиназы. Другие же аминокислоты оказывали наибольший стимулирующий эффект в ранней стационарной фазе, в поздней же фазе роста эффект был незначительным [19]. Действие аминокислот, приводящих к ингибированию выхода в среду фермента, можно описать по принципу репрессии конечным продуктом, а следовательно, их внесение в среду нецелесообразно [11].

В условиях солевого стресса возможно увеличение синтеза субтилизиноподобной сериновой протеиназы за счет внесения в состав питательной среды хлорида или цитрата натрия. Данный механизм регулируется белками DegS-DegU [13]. Данная регуляторная пара способна координировать действия почти 120 генов, что позволяет правильно функционировать бактериальным клеткам в изменяющихся условиях [4].

В работе Ю.М. Кирилловой установлено, что экспрессия гена субтилизиноподобной протеиназы в начале стационарной фазы (28 ч) зависит от катабалитной репрессии, а в поздней стационарной фазе (48 ч) зависимость не установлена [14].

Также было отмечено, что чем ниже скорость роста культуры, тем выше скорость накопления в средекатаболитных ферментов. Происходит это за счет того, что на более ранних стадиях развития штамма происходит репрессия синтеза фермента, а на более поздних стадиях этого не происходит [20].

Было установлено, что синтез глутамилэндопептидазы наблюдается на 18, 48 и 78 ч роста культуры. При этом отмечается, что выход фермента на 48 ч превышает в 2 раза выход в фазе замедленного роста на 18 ч, а на 78 ч в 3 раза. Также было установлено, что на стадии споруля-

ции внесение в среду экзогенной глюкозы не ингибирует синтез фермента, тогда как в стационарной фазе происходит катаболитная репрессия [9].

Таким образом, на основе изучения данных научной литературы установлено, что ферменты, продуцируемые бактериями рода *Bacillus*, участвуют в таких процессах, как адаптация к изменяющимся условиям окружающей среды, за счет расширения питательных субстратов, имеют важное значение для процесса спорообразования (участие в синтезе спорных оболочек, при прорастании спор).

На синтез ферментов влияют такие показатели, как репрессия генов, состав питательной среды. Варьируя данные показатели, можно получать различное количество вырабатываемых ферментов. В условиях азотного, солевого, фосфатного голодания у бактерий происходит повышение экспрессии генов, отвечающих за утилизирование вторичных источников. Внесение в среду различных источников азота, фосфора, аминокислот и т. д. способствует повышению или снижению синтеза фермента.

Количество вырабатываемого фермента бактериями *Bacillus subtilis* зависит от стадии роста культуры, так как в фазе замедленного роста наблюдается наибольший показатель выхода фермента.

#### Список литературы

1. Карпов Д.С., Домашин А.И., Котлов А.И. Биотехнологический потенциал штамма *Bacillus subtilis* 20 // Микробиология. 2020. Т. 54. № 1. С. 137-145.
2. Балабан Н.П., Шарипова М.Р. Практическое применение бациллярных протеаз // Ученые записки Казанского государственного университета. 2011. Т. 153. Кн. 2. С. 29-40.
3. Маликова Л.А., Марданова А.М., Соколова О.В., Балабан Н.П. Условия биосинтеза внеклеточной субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* КММ 62 // Микробиология. 2007. Т. 76. № 3. С. 313-320.
4. Тойменцева А.А., Шарипова М.Р. Генетические механизмы адаптации бацилл // Микробиология. 2013. Т. 82. № 3. С. 259-273.
5. Каюмов А.Р., Балабан Н.П., Марданова А.М., Костров С.В. Биосинтез субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* в условиях солевого стресса // Микробиология. 2006. Т. 75. № 5. С. 642-648.
6. Михайлова Е.О., Марданова А.М., Руденская Г.Н., Балабан Н.П. Биохимические свойства субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* в стационарной фазе роста // Биохимия. 2009. Т. 74. Вып. 3. С. 380-388.
7. Михайлова Е.О., Марданова А.М., Балабан Н.П., Руденская Г.Н., Шарипова М.Р. Выделение и характеристика субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis*

- AJ 73 на разных фазах роста бацилл // Биохимия. 2007. Т. 72. № 2. С. 228-236.
8. Балабан Н.П., Марданова А.М., Маликова Л.А., Ильинская О.Н. Биосинтез субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus atyloliquefaciens* H2 и биологические свойства фермента // Ученые записки Казанского государственного университета. Т. 150. № 2. С. 81-90.
  9. Частухина И.Б., Шарипова М.Р., Габдахманова Л.А., Балабан Н.П. Регуляция биосинтеза внеклеточной глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* в рекомбинантном штамме *Bacillus subtilis* на стадии спорообразования // Микробиология. 2004. Т. 73. № 3. С. 335-342.
  10. Демидюк И.В., Чухонцева К.Н., Костров С.В. Глутамилэндопептидазы: загадка субстратной специфичности // Actanaturae. 2017. Т. 9. № 2. С. 18-34.
  11. Соколова Е.А. Выделение и характеристика протеиназ поздней фазы роста *Bacillus intermedius* 3-19: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Казанский государственный университет. Казань, 2006. 26 с.
  12. Шамсутдинов Т.Р. Глутамилэндопептидаза *Bacillus intermedius*, секретируемая рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* на разных фазах роста: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Казанский государственный университет. Казань, 2009. 24 с.
  13. Каюмов А.Р., Шарипова М.Р. Механизмы регуляции синтеза бактериальных субтилаз // Ученые записки Казанского государственного университета. 2007. Т. 147. Кн. 2. С. 89-98.
  14. Кириллова Ю.М. Экспрессия субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius* в рекомбинантных штаммах *Bacillus subtilis*: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Казанский государственный университет. Казань, 2006. 28 с.
  15. Харитонова М.А., Вершинина В.И. Биосинтез секретируемых рибонуклеаз *Bacillus intermedius* и *Bacillus circulans* в условиях азотного голодания // Микробиология. 2009. Т. 78. № 2. С. 220-225.
  16. Каюмов А.Р., Шамсутдинов Т.Р., Сабирова А.Р., Шарипова М.Р. Влияние системы регуляции азотного обмена на биосинтез сериновых протеиназ *Bacillus intermedius* // Микробиология. 2009. Т. 78. № 6. С. 742-748.
  17. Gabdrakhmanova L., Shakirov E., Balaban N. Optimized medium for the efficient production of *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase by the recombinant *Bacillus subtilis* strain AJ73 // Microbiology. 2000. Vol. 69. № 5. P. 546-551.
  18. Ульянова В.В., Вершинина В.И., Харитонова М.А., Шарипова М.Р. Влияние SpoOA и AbrB белков на экспрессию генагуанилспецифичных рибонуклеаз *Bacillus intermedius* и *Bacillus pumilus* в рекомбинантных штаммах *Bacillus subtilis* // Микробиология. 2007. Т. 75. № 5. С. 639-644.
  19. Kirillova Yu., Mikhailova E.O., Balaban N.P. Biosynthesis of the *Bacillus intermedius* subtilisin-like serine proteinase by the recombinant *Bacillus subtilis* strain // Microbiology. 2006. Vol. 75. № 2. P. 142-147.
  20. Частухина И.Б. Регуляция синтеза глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* в стационарной фазе роста рекомбинантных штаммов *Bacillus subtilis*

*lis*: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Казанский государственный университет. Казань, 2004. 28 с.

Статья поступила в редакцию 22.03.2021  
Одобрена после рецензирования 28.04.2021  
Принята к публикации 17.05.2021

**Информация об авторе:**

**Аникеева Виктория Сергеевна**, магистрант по направлению подготовки «Биотехнология», Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, г. Тамбов, Российская Федерация, anikeeva\_v@mail.ru

**FEATURES OF THE PRODUCTION OF ENZYMES BY THE BACTERIUM *BACILLUS SUBTILLIS***

**Viktoriya S. Anikeeva**, Master's Degree Student in "Biotechnology" Programme, Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russian Federation, anikeeva\_v@mail.ru

*Abstract.* We consider the mechanisms of enzyme formation in individual representatives of the genus *Bacillus*. The dependence of the formation of the enzyme on the composition of the nutrient medium and the growth phase of the culture is established. Thus, it is shown that a greater amount of the enzyme is produced in the late stationary phase than in the early stationary phase. The composition of the nutrient medium plays an important role in the production of the enzyme, for example, glucose contributes to the catabolite repression of the gene responsible for the production of enzymes, and a small amount of sucrose, on the contrary, increases the synthesis.

*Keywords:* bacterial enzymes, *Bacillus subtilis*, subtilisin-like proteinase, glutamyl endopeptidase

The article was submitted 22.03.2021  
Approved after reviewing 28.04.2021  
Accepted for publication 17.05.2021