

На правах рукописи



СОКОЛОВА ЕВГЕНИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА
ПРОТЕИНАЗ ПОЗДНЕЙ ФАЗЫ РОСТА
BACILLUS INTERMEDIUS 3-19**

03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2006

Работа выполнена на кафедре микробиологии биолого-почвенного факультета ГОУВПО «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина».

Научный руководитель: кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Нэлли Павловна Балабан

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Казанской государственной ветеринарной академии им. Н.Э. Баумана профессор Госманов Рауис Госманович
кандидат биологических наук, заведующий отделением культивирования и идентификации вирусов РЦПБ СПИД и ИБ МЗ РТ старший научный сотрудник Уразов Наиль Гумерович


Ведущая организация: Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН

Защита диссертации состоится «14» декабря 2006 г. в 14³⁰ 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, д.18, главное здание, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Казанского государственного университета

Автореферат разослан «9» ноября 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



З.И. Абрамова

Актуальность проблемы. Протеолитические ферменты представляют собой уникальную группу биологических катализаторов. Функции этих ферментов разнообразны – они принимают участие в процессах катаболизма, посттрансляционном процессинге белков, задействованы в процессах эмбриогенеза эукариот. Выявленная в последние годы способность микробных протеиназ к осуществлению реакции селективного протеолиза таких белков крови человека, как фибрин, плазминоген и протеин С, определяет перспективность использования этих ферментов для коррекции гемостаза человека при профилактике, диагностике и лечении атеросклероза и таких его последствий, как тромботические состояния. Важным свойством протеиназ является их способность к ферментативному синтезу олигопептидов, что перспективно для получения биологически активных соединений и лекарственных препаратов. В настоящее время с помощью этого метода получают аспартам (искусственное подслащивающее вещество).

Одним из наиболее интересных семейств класса протеолитических ферментов являются сериновые протеиназы бактерий. В стационарной фазе роста бактерии секретируют сериновые и нейтральные протеиназы, которые играют определенную роль в адаптационных процессах и, в частности, в спорообразовании. Показано, что сериновые протеиназы принимают непосредственное участие в процессе синтеза споровой оболочки и прорастании спор. Так, протеиназа TesA, секретирующаяся в среду спорулирующими клетками *Bacillus subtilis*, вовлекается в построение оболочки споры [Setgano et al., 1999]. Обнаружено, что продукт гена *clpP* представляет собой протеиназу, играющую важную роль в период стационарной фазы роста *B. subtilis*. Этот белок является определяющим для роста клеток в условиях теплового шока [Msadek et al., 1988]. Неослабевающий интерес к этим белкам обусловлен также широтой практического применения. Выход целевого продукта у бактерий может быть существенно повышен за счет направленного воздействия на условия роста, использования штаммов с нарушениями систем регуляции либо модификацией гена. На основе протеиназ бактерий конструируются каталитические антитела с протеолитической активностью. Выделены протеиназы бактерий, обладающие фибринолитическими и тромболитическими свойствами. В связи с ростом числа тромбических заболеваний актуальным является поиск новых эффективных протеолитических ферментов, обладающих высокой активностью, специфичностью и низкой токсичностью. Одной из подгрупп сериновых протеиназ являются глутамилэндопептидазы, обладающие узкой субстратной специфичностью. Они используются как высокоточные «инструменты» для фрагментации белковых молекул при исследовании их первичной структуры, а также как удобные модели для конструирования белков с заданными свойствами.

Целью настоящей работы явилось выделение глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемых в поздней стационарной фазе роста бактерий, очистка и изучение свойств этих ферментов.

Основные задачи исследования.

1. Исследование влияния экзогенных факторов питательной среды на накопление внеклеточных протеиназ *B. intermedius* в поздней стационарной фазе роста бактерий.

2. Выделение из культуральной жидкости *B. intermedius* гомогенных препаратов протеиназ и их идентификация.
3. Исследование влияния ингибиторов на активность ферментов.
4. Определение энзиматических и каталитических свойств ферментов.
5. Определение субстратной специфичности глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной сериновой протеиназы.
6. Установление аминокислотного состава и N-концевой последовательности протеиназ *B. intermedius*.

Научная новизна. Установлено, что бактерии *B. intermedius* 3-19 активно синтезируют и секретируют протеолитические ферменты в течение всей стационарной фазы роста. Впервые из культуральной жидкости *B. intermedius* 3-19 в поздней стационарной фазе роста выделены глутамилэндопептидаза и субтилизиноподобная протеиназа, так называемые поздние ферменты. Определены условия биосинтеза обоих ферментов и подобран состав питательной среды для максимального синтеза этих протеиназ. Получены данные, свидетельствующие о том, что каталитические характеристики ранних и поздних протеиназ различны, тогда как энзиматические и физико-химические свойства схожи. Установлены N-концевые последовательности аминокислот для глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы поздней стационарной фазы роста и показано, что они идентичны ранним ферментам.

Практическая значимость. Полученные в работе результаты позволяют использовать штамм *B. intermedius* 3-19 как эффективный продуцент протеолитических ферментов. Подобраны оптимальные питательные среды для максимальной продукции глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы поздней стационарной фазы роста. Разработаны методы очистки поздних белков. Получение гомогенных препаратов ферментов увеличивает арсенал белков, используемых в научных исследованиях и в практических целях. Результаты исследования свойств ферментов поздней стационарной фазы роста позволяют расширить наши представления о сериновых протеиназах, в частности о субтилизиноподобных протеиназах и об особой подгруппе ферментов – глутамилэндопептидазах.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование: 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»; № государственной регистрации 01.2.006 09683 «Механизмы регуляции функциональной активности клетки»). Научные исследования поддержаны грантами РФФИ 01-04-48037, 05-04-48182а, АНТ 03.3.10-11, 03.3.10-295 и грантом Программы CRDF REC 007. Исследования получили персональную поддержку Правительства Российской Федерации (2002 г.) и были удостоены специальной медали Российской академии наук с премиями для молодых ученых РАН (2003 г.).

Положения, выносимые на защиту.

1. Впервые обнаружены, выделены и охарактеризованы протеолитические ферменты (глутамилэндопептидаза и субтилизиноподобная протеиназа) поздней стационарной фазы роста *B. intermedius* 3-19.

2. Ферменты ранней и поздней фазы роста *B. intermedius 3-19* имеют определенные различия в каталитических характеристиках, а именно, различаются по константе Михаэлиса и каталитической константе.

3. Идентичные аминокислотные последовательности N-концов глутамилэидопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы ранней и поздней фазы роста *B. intermedius 3-19* позволяют считать эти ферменты продуктами экспрессии одного гена, а различия в каталитических характеристиках связать с возможной посттранскрипционной модификацией белков *B. intermedius 3-19*.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных и региональных конференциях: 9-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2005г.), итоговых научных конференциях Казанского государственного университета (2002 г. – 2004 г.), XLII международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс», секция биология (Новосибирск, 2004), FEMS Congress of European Microbiologist «*Bacillus-2003*» (Ljubljana, Slovenia, 2003), на V симпозиуме по химии протеолитических ферментов (Москва, 2002), на III съезде Биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002), а также на семинарах кафедры микробиологии и Института биологии Казанского государственного университета.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 24 научные работы.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю кандидату биологических наук Н.П. Балабан; благодарит доктора химических наук Г.Н. Руденскую (МГУ им. Ломоносова) за возможность определения энзиматических свойств ферментов на базе её лаборатории; доктора биологических наук О.Н. Ильинскую и кандидата биологических наук Л.А. Габдрахманову за поддержку и помощь в обсуждении результатов; доктора биологических наук М.Р. Шарипову за внимательное отношение к работе.

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 140 страницах машинописного текста, включает 5 таблиц, 24 рисунка. Библиография содержит 147 наименований российских и зарубежных авторов.

Материалы и методы

Бактериальный штамм. Объектом исследования служил штамм *B. intermedius 3-19* (В-3833, Всесоюзная коллекция промышленных микроорганизмов), выделенный из штамма *Bacillus intermedius 7P* (коллекция кафедры микробиологии Казанского государственного университета) методом посева на среде, содержащей стрептомицин (500 мкг/мл). Штамм *B. intermedius 3-19* был отобран из числа антибиотикоустойчивых штаммов *B. intermedius* по признаку максимальной продукции протеиназы.

Исходной средой для культивирования клеток служила среда следующего состава (г/л): $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3, NaCl – 3,0, MnSO_4 – 0,1, пептон – 20 г/л. pH среды равен 8,5. Среду стерилизовали при 1 атм в течение 1 часа. Растворы неорганического фосфата (Na_2HPO_4) и растворы солей

двухвалентных металлов стерилизовали при 1 атм и вносили в среду перед посевом: неорганический фосфат в конечной концентрации 0,2 г/л, ионы металлов – 2, 5 и 10 мМ. Растворы дрожжевого экстракта, казеина по Гаммерстену и желатина стерилизовали при 0,5 атм и вносили в питательную среду в конечной концентрации 0,1%, 0,5% и 1%. Растворы стерильных LD-аминокислот вносили в среду до конечной концентрации 1,0 мг/мл. Растворы цитрата аммония и хлористого аммония стерилизовали при 1 атм и вносили в среду перед посевом до конечной концентрации 2 – 8 мМ.

Культивирование проводили при 30° на вибростенде, 200 об/мин. Соотношение объёма среды к объёму колбы составляло 1:5. Посевным материалом служила 12 - 18 часовая культура (1% v/v), выращенная на среде с добавлением 500 мкг/мл стрептомицина.

При исследовании влияния глюкозы на биосинтез поздних протеиназ вносили стерильный раствор глюкозы в опытные колбы в конечной концентрации 2% перед началом культивирования и в концентрации 1% на 34-й, 36-й и 38-й часы роста для глутамилэндопептидазы, и 36-й, 38-й и 40-й часы для субтилизиноподобной протеиназы. В течение 6 часов через каждые 2 часа из колб отбирали пробы для определения прироста биомассы и активности.

Количество свободных спор выражали в процентах по отношению к общему числу вегетативных и спорулирующих клеток (100%), подсчет которых проводили в режиме фазово-контрастной микроскопии (микроскоп Carl Zeiss Jena) при увеличении в 1600 раз в 5 - 10 полях зрения. В качестве инокулята использовали синхронную 50-часовую культуру.

Прирост биомассы измеряли нефелометрически на КФК-2 при длине волны 590 нм. Количество биомассы выражали в единицах светопоглощения в кювете толщиной 1 см.

Продуктивность культуры в отношении синтеза протеиназ определяли как отношение величины протеолитической активности в культуральной жидкости к величине биомассы и выражали в условных единицах [Перт с соавт., 1980] или в процентах относительно контроля.

Для получения чистых ферментов культуральную жидкость освобождали от клеток центрифугированием в течение 60 минут при 3000 об/мин на центрифуге К-70 (Janetzki, Польша).

Белок и протеолитическая активность. Белок определяли спектрофотометрически, считая, что концентрация белка 1 мг/мл соответствует $A_{280} = 1$ оптической единице (оп. ед.) в кювете толщиной 1 см.

Определение протеолитической активности протеиназ проводили по гидролизу казеина [Каверзнева с соавт., 1971] и синтетических хромогенных субстратов [Мосолова с соавт., 1987].

За единицу казеинолитической активности принимали количество фермента, необходимое для образования 1 мкМ тирозина за 1 мин на 1 мл ферментного раствора.

Протеолитическую активность глутамилэндопептидазы определяли по гидролизу синтетического субстрата Z-Glu-pNa, активность субтилизиноподобной протеиназы определяли с помощью синтетического субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa.

За единицу активности ферментов по гидролизу синтетических субстратов принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1мМ субстрата за 1 мин. За единицу активности ферментов, определяемых в культуральной жидкости, принимали количество фермента, гидролизующее 1нМ субстрата за 1 мин.

Продуктивность культуры определяли как отношение величины протеолитической активности к величине биомассы и выражали в условных единицах или процентах.

Поскольку синтетические полипептиды Z-Glu-pNa и Z-Ala-Ala-Leu-pNa являются специфическими субстратами для глутамилэндопептидаз и субтилизиннов, соответственно, то их использовали для идентификации полученных после хроматографии на колонке МоноS белковых пиков.

Активность β-галактозидазы определяли в соответствии со стандартным методом, как описано ранее [Балабан с соавт., 2003].

За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало увеличение оптической плотности на одну оптическую единицу при 420 нм на 1 мл ферментного препарата за 1 час инкубации при 37°.

Для получения клеточного лизата клетки бактерий разрушали при 0° с помощью ультразвука (УЗДИ-IV 4.2) при частоте 22 кГц (15 раз по 30 сек). Затем в лизатах клеток определяли активность β-галактозидазы.

Выделение и очистка поздних протеиназ. Культуральную жидкость *B. intermedius* освобождали от клеток центрифугированием, доводили до pH 6,3, разводили водой в 10 раз и добавляли к КМ-целлюлозе, уравновешенной 0,02 М Na-ацетатным буфером, pH 6,3, перемешивали в течение 10 – 15 мин., отстаивали, надосадочную жидкость декантировали. Затем КМ-целлюлозу помещали в колонку (1,5 x 17 см), промывали уравновешивающим буфером и элюировали 0,2 М Na-ацетатным буфером, pH 6,3. Элюат разбавляли в 10 раз и наносили на колонку МоноS 5/5 в системе FPLC «Pharmacia», уравновешенную 0,015 М Na-ацетатным буфером, pH 6,3, содержащим 0,5 мМ CaCl₂. Элюцию проводили линейным градиентом (0-0,5М NaCl) в том же буфере со скоростью 1 мл/мин. Для получения хроматографически гомогенных препаратов белков проводили рехроматографию на колонке МоноS в тех же условиях. Полученные белки, активные по Z-Glu-pNa или Z-Ala-Ala-Leu-pNa, обессоливали на сефадексе G-25 и лиофильно высушивали [Остерман с соавт., 1985, Скоупс Р., 1985].

Физико-химические и кинетические свойства ферментов. Для определения степени чистоты препаратов ферментов и их молекулярной массы проводили электрофорез в 12,5%-ном ПААГ в присутствии 0,1% DS-Na по методу Лаэммли [Laemmli, 1970]. В качестве белков-маркеров использовали бычий сывороточный альбумин (67 кДа), овальбумин (43 кДа), ингибитор трипсина (20,1 кДа) и лизоцим (14,4кДа). Для определения констант Михаэлиса (K_m) использовали субстраты Z-Glu-pNa, а также субстрат Z-Ala-Ala-Leu-pNa, растворенный в 20% диметилформамиде (ДМФА) в концентрации 0,2 – 3,3 мМ. Начальные скорости гидролиза субстратов определяли на спектрофотометре при длине волны 400 нм и 20° с временным интервалом равным 1 мин., считая молярный коэффициент поглощения для п-нитроанилина равным 8900 М⁻¹см⁻¹. Величину K_m определяли графически из зависимости 1/[v] от 1/[S] [Ленинджер, 1985].

Изоэлектрические точки белков определяли методом изоэлектрофокусирования в 5% полиакриламидном геле в присутствии 2% амфолинов Biolyte 3/10 в мини-колонке IEF Cell (Bio-Rad, США). Для калибровки колонки использовали коммерческий набор маркерных белков («Serva», Германия).

Влияние ингибиторов на активность ферментов. Влияние ингибиторов на активность ферментов определили, используя DFP, PMSF, TLCK, EDTA, офенантролин, бензамидин и HgCl_2 в молярном соотношении фермент:ингибитор 1:100; p-CMB в соотношении 1:130. Белковые ингибиторы: утиный овомукоид, соевый ингибитор трипсина, ингибитор из морской анемоны использовали в молярном соотношении 1:10. Ингибирование проводили в течение 1 часа, инкубируя пробы при 22°, после чего определяли остаточную активность по гидролизу синтетических хромогенных субстратов.

Энзиматические свойства ферментов. pH-Оптимум протеиназ определяли, используя в качестве субстратов казеин, Z-Glu-pNa и Z-Ala-Ala-Leu-pNa. Для казеина использовался буфер 0,1 М трис-HCl буфер, pH 7,2 – 10,0; для синтетического хромогенного субстрата Z-Glu-pNa – 0,1 М трис-HCl буфер при значениях pH от 7,2 до 9,5; для субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa – 0,05М трис-HCl буфер при значениях pH 7,5 – 10,0.

pH-Стабильность ферментов определяли по гидролизу синтетических хромогенных субстратов в тех же условиях. Ферменты инкубировали в 0,1 М трис-HCl буфере при различных значениях pH (7,2 – 9,5) в течение 2 часов при комнатной температуре в присутствии и в отсутствие 0,5 мМ CaCl_2 , после чего определяли активность по стандартной методике. В качестве контроля (100%) считали активность ферментов, полученную без предварительной инкубации.

Температурный оптимум ферментов также определяли по гидролизу синтетических хромогенных субстратов, инкубируя реакцию смесь при температурах от 22° до 65° в присутствии 0,5 мМ Ca^{2+} и в его отсутствие.

При изучении термостабильности растворы ферментов инкубировали 2 часа при температурах 22° - 60° в присутствии и в отсутствие 0,5 мМ CaCl_2 и определяли активность для протеиназ по гидролизу синтетических субстратов. Контролем считали активность ферментов без предварительного прогрета.

Определение субстратной специфичности поздних протеиназ. Субстратную специфичность глутамилэндопептидазы определяли по гидролизу синтетических тетрапептидов 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-Gly-Ala-Ala-Glu-pNa, Z-Ala-Ala-Trp-Asp-pNa, Z-Ala-Ala-Leu-Asp-pNa, Z-Ala-Ala-Phe-Asp-pNa, Z-Ala-Ala-Met-Asp-pNa, Z-Gly-Ala-Ala-Asp-pNa, а также Z-Glu-pNa [Люблинская с соавт., 1987]. Расщепление синтетических олигопептидов проводили в 0,025 М трис-HCl буфере, pH 8,5 при 37° в течение 30 минут. К растворам субстратов в концентрации 1 мг/мл в 0,025 М трис-HCl, pH 8,5 с 5 мМ CaCl_2 добавляли 10 мкл раствора фермента (1 мкг/мл) в том же буфере и инкубировали 4 часа при 37°. Высушенные гидролизаты разделяли в режиме FPLC на колонке (4,6x250 мм) Ultrasphere Ocutyl, используя линейный градиент вода – 70% ацетонитрила в присутствии 0,1% CF_3COOH . Элюаты регистрировали при 215 и 280 нм и анализировали на аминокислотном анализаторе Hitachi 835 (Япония).

Определение аминокислотного состава и N-концевой последовательности ферментов. Аминокислотный состав протеиназ определяли после гидролиза 5,7 н HCl при 105° в течение 48 часов на аминокислотном анализаторе Hitachi 835 (Япония). Остатки полуцистина и метионина определяли после их окисления надмуравьиной кислотой, триптофан – после гидролиза белка метансульфоновой кислотой в присутствии 0,2%-ного триптамина. N-концевую последовательность глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы определяли по методу Эдмана в образцах, полученных после дополнительной очистки хроматографией на колонке (4,6x100 мм) Aquapore («Applied Biosystems», USA) в градиенте концентраций (15-16%) ацетонитрила с 0,1% трифлуoroацетовой кислотой в течение 40 мин с помощью HPLC. Белки затем иммобилизовали на мембранах Immobilon P и секвенировали на приборе Клауер-816 («Applied Biosystem» 120 A PИH, Analyzer One Line, USA).

Результаты и их обсуждение

Нами показано, что в поздней стационарной фазе роста клетки *B. intermedius* секретируют два протеолитических фермента: глутамилэндопептидазу с максимальной активностью на 40-й час роста и субтилизиноподобную протеиназу с максимальной активностью на 44 час (рис. 1).

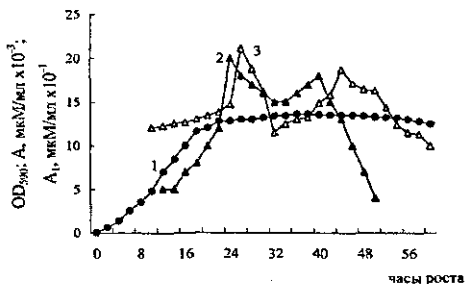


Рис. 1. Динамика роста и биосинтеза протеиназ *Bacillus intermedius*
 1 - рост культуры (OD₅₉₀), 2 - активность глутамилэндопептидазы (A₁),
 3 - активность субтилизиноподобной протеиназы (A)

Для отличия поздних ферментов от известных и хорошо изученных ферментов ранней стационарной фазы роста *B. intermedius* мы обозначили обнаруженные ферменты индексом 2.

С помощью биохимического маркера β-галактозидазы определяли целостность клеток в момент максимального накопления поздних протеиназ. Активность β-галактозидазы в культуральной жидкости остается на низком уровне до 44 часа роста, а к 50 часу резко возрастает. При этом количество свободных спор достигает своего максимума на 56 – 60 час роста (80%). Следует отметить также, что максимальная активность поздних протеиназ соответствует поздним стадиям спорообразования (стадии V-VII) (рис. 2). Полученные результаты

свидетельствуют о целостности клеток в период накопления ферментов поздней стационарной фазы роста [Балабан с соавт., 2001].

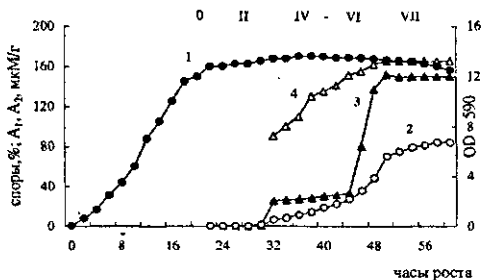


Рис. 2. Динамика спорообразования и накопления β-галактозидазной активности *B. intermedius*

1- рост культуры (OD₅₉₀), 2- количество спор, 3- активность β-галактозидазы в культуральной жидкости (A₁), 4- активность β-галактозидазы в лизатах клеток (A₂)

I. Подбор компонентов питательной среды для максимальной продукции ферментов *B. intermedius*

Синтез внеклеточных ферментов в значительной степени определяется составом среды культивирования [Adinarayana, Ellaiah, 2002]. Мы подбирали оптимальное соотношение концентраций двух основных для максимальной продукции ферментов компонентов питательной среды – пептона и неорганического фосфата в двухфакторных экспериментах с последующим обчетом результатов в программе «BIOPT». Было установлено, что оптимальные концентрации пептона и неорганического фосфата, необходимые для максимальной активности и продуктивности глутамилэндопептидазы 2, составляют 19 и 0,3 г/л соответственно, для максимальной активности и продуктивности субтилизиноподобной протеиназы 2 – 22 и 0,24 г/л, соответственно (рис.3). Полученные данные коррелируют с результатами для ранних белков *B. intermedius*, лишь для глутамилэндопептидазы 2 неорганического фосфата требуется больше, чем для глутамилэндопептидазы 1 (0,3 г/л против 0,2 г/л, соответственно) [Шакиров с соавт., 2000].

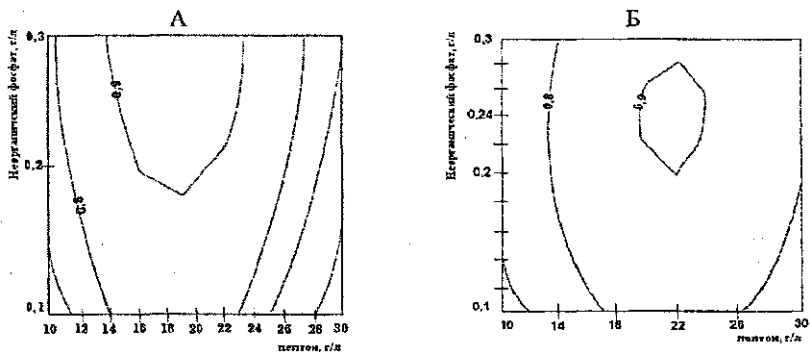


Рис. 3. Влияние соотношения концентраций пептона и неорганического фосфата на накопление ферментов поздней фазы роста. За единицу принята максимальная активность протеиназы. А – глутамилэндопептидаза, Б – субтилизиноподобная протеиназа

Исследовали влияние на биосинтез глутамилэндопептидазы 2 и субтилизиноподобной протеиназы 2 *B. intermedius* ряда индивидуальных аминокислот – ароматической (триптофан), гидрофобных (аланин, валин и лейцин), а также лизина. Внесение в среду, содержащую пептон, индивидуальных аминокислот в концентрации 1% вызывало интенсивный рост клеток *B. intermedius*, но ингибировало синтез протеиназ поздней стационарной фазы роста. Аланин, лейцин, лизин и триптофан снижали продуктивность культуры в отношении синтеза глутамилэндопептидазы 2 на 45-50%, валин – на 20%. Наибольший ингибиторный эффект для субтилизиноподобной протеиназы 2 наблюдался при внесении в среду культивирования 1% аланина и валина (до 40%). Исследование влияния ионов аммония в виде цитрата аммония на продукцию поздних протеиназ *B. intermedius* показало подавляющий эффект (до 30%) в отношении синтеза обоих ферментов. Наличие хлористого аммония в среде культивирования не влияло на продуктивность культуры. Похожие результаты получены при исследовании влияния индивидуальных аминокислот и солей аммония на продукцию ранних протеиназ *B. intermedius* [Ицкович с соавт., 1995; Шакиров с соавт., 2000]. Таким образом, присутствие в среде аминокислот и ионов аммония подавляет синтез протеиназ *B. intermedius* по типу репрессии конечным продуктом, поэтому внесение их в среду культивирования нецелесообразно.

При исследовании влияния дрожжевого экстракта на биосинтез глутамилэндопептидазы 2 и субтилизиноподобной протеиназы 2 *B. intermedius* установлено, что при добавлении его в среду в концентрации 0,1–1,0% рост культуры не изменяется, а продуктивность культуры в отношении синтеза обеих протеиназ снижается по сравнению с контрольным вариантом. При дальнейшем увеличении концентрации дрожжевого экстракта в среде это снижение становится интенсивнее. Таким образом, внесение дрожжевого экстракта в среду для

биосинтеза протеиназ поздней стационарной фазы роста *B. intermedius* нецелесообразно. Такие же результаты получены для глутамилэндопептидазы 1, секретируемой в период вегетативного роста, тогда как для субтилизиноподобной протеиназы 1, секретируемой в начале стационарной фазы роста *B. intermedius*, показано увеличение активности фермента при внесении в среду 0,5% кукурузного экстракта [Ицкович с соавт., 1995].

Внесение в среду культивирования 0,1–1,0% желатина и казеина приводит к увеличению роста и к снижению удельной активности глутамилэндопептидазы 2. Подобные результаты получены и для глутамилэндопептидазы 1. Для субтилизиноподобной протеиназы 2 *B. intermedius* показано увеличение продуктивности культуры в отношении синтеза фермента на 40%. Таким образом, для максимального накопления субтилизиноподобной протеиназы 2 необходимо добавлять в питательную среду 0,1% казеина.

Исследовали влияние ионов двухвалентных металлов на биосинтез протеиназ поздней стационарной фазы роста *B. intermedius*. Для глутамилэндопептидазы 2 установлено, что в присутствии 5 мМ ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} увеличивается удельная активность на 13% и 20% соответственно, для субтилизиноподобной протеиназы 2 - 5 мМ Mg^{2+} и Ca^{2+} увеличивают удельную активность на 30% и 10%, соответственно. Таким образом, для максимального накопления протеиназ *B. intermedius* поздней фазы роста необходимо вносить в питательную среду 5 мМ ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} . Ранее были получены схожие данные о положительном влиянии ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} на биосинтез глутамилэндопептидазы 1 исходным штаммом *B. intermedius* и рекомбинантным штаммом *B. subtilis* [Габдрахманова с соавт., 2000].

Для выяснения влияния глюкозы на синтез сериновых протеиназ в поздней стационарной фазе роста культуры, в питательную среду добавляли 1% глюкозы на 34–40 часы роста *B. intermedius*. Показано, что уровень активности глутамилэндопептидазы 2 и субтилизиноподобной протеиназы 2 не понижается в присутствии глюкозы в течение 6 часов после внесения ее в питательную среду, то есть не происходит репрессии биосинтеза ферментов глюкозой. Из литературы известно, что глюкоза, внесенная в питательную среду перед началом культивирования, подавляет синтез протеолитических ферментов. Подобные результаты были получены и для глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы ранней стационарной фазы роста *B. intermedius* [Шакиров с соавт., 2000].

Определяли количество спор в культуральной жидкости *B. intermedius* в отсутствие глюкозы и при внесении ее в среду на 32 час, то есть перед появлением в культуральной жидкости поздних белков. Показано, что свободные споры появляются в контрольной среде и в среде с глюкозой на 38–40 часы роста культуры. В последующие часы культивирования увеличение количества свободных спор наблюдается на обеих средах, но на контрольной среде лизис клеток и освобождение спор идет интенсивнее, чем на среде с глюкозой. Полученные данные свидетельствуют, что процессы спорообразования и синтеза протеолитических ферментов на поздних стадиях развития культуры взаимосвязаны и не регулируются по механизму катаболитной репрессии [Шарипова с соавт., 2000]. По-видимому, на разных этапах развития культуры

происходит смена механизмов регуляции экспрессии поздних генов, которые активируются в период стационарного роста иным способом, чем в период вегетативного роста.

II. Выделение ферментов *Bacillus intermedius* поздней фазы роста и определение их свойств

Выделение и очистку сериновых протеиназ поздней стационарной фазы роста *Bacillus intermedius* 3-19 проводили с помощью ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе и высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке MonoS. После хроматографии на MonoS были получены две белковые фракции, которые по гидролизу синтетических хромогенных субстратов были идентифицированы как глутамилэндопептидаза и субтилизиноподобная протеиназа (рис. 4). Так как в результате одностадийной высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке MonoS препараты белков не были гомогенными, проводили рехроматографию в тех же условиях. За три стадии очистки получены препараты белков, чистота которых подтверждена электрофорезом в 12% ПААГ (рис. 5). Молекулярная масса глутамилэндопептидазы 2, определенная нами электрофоретически, равна 26,5 кДа, молекулярная масса, рассчитанная по аминокислотной последовательности, равна 23 кДа [Rebrikov et al., 1999]. Электрофорез препарата субтилизиноподобной протеиназы 2 показал наличие одного полипептида с молекулярной массой 28 кДа, что совпадает с молекулярной массой, рассчитанной по аминокислотной последовательности (27,5 кДа) [Sharipova et al, 2006]. Константа Михаэлиса глутамилэндопептидазы 2 равна 0,5 мМ, в то время как константа Михаэлиса глутамилэндопептидазы 1 *B. intermedius* равна 6 мМ [Leschinskaya et al., 1997]. Каталитическая константа глутамилэндопептидазы 2 из *B. intermedius* 3-19 – 81 сек⁻¹. Константы Михаэлиса и $K_{кат}$ субтилизиноподобной протеиназы 2 равны 0,0054 мМ и 16545 сек⁻¹, соответственно. Константы Михаэлиса $K_{кат}$ субтилизиноподобной протеиназы 1 равны 1,25 мМ и 0,15 сек⁻¹, соответственно [Ицкович с соавт., 1997]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что гидролитические ферменты, секретируемые клетками *Bacillus intermedius* 3-19 в поздней стационарной фазе роста, значительно активнее связывают и расщепляют субстрат, чем протеиназы ранней стационарной фазы роста. Высокая протеолитическая активность субтилизиноподобной протеиназы 2, возможно, связана с её функциональной ролью на поздних стадиях спорообразования, когда клетка подвергается значительным физиологическим и морфологическим изменениям. Изoeлектрическая точка глутамилэндопептидазы 2 *B. intermedius* 3-19 равна 8,4 и соответствует изoeлектрической точке глутамилэндопептидазы 1.

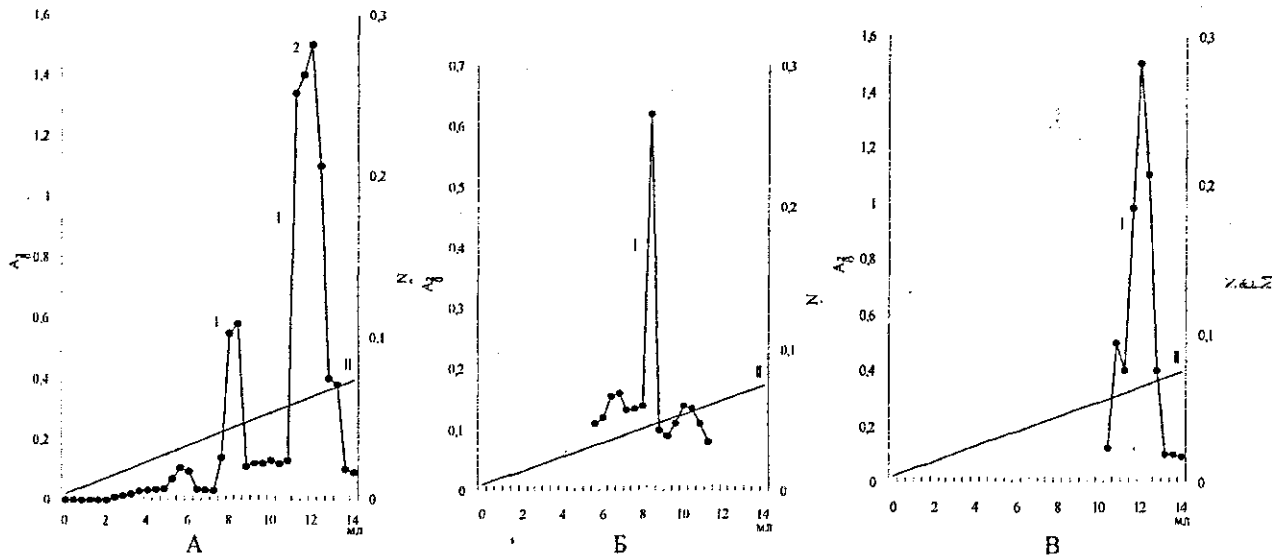


Рис. 4. А. Хроматография протсиназ *B. intermedius* на колонке MonoS

1 – протсиназа, активная по гидролизу субстрата Z-Glu-pNA,

2 - протсиназа, активная по гидролизу субстрата Z-Ala-Ala-Lcu-pNA;

Б. Рехроматография глутамилэндопептидазы *B. intermedius* на колонке MonoS;

В. Рехроматография субтилизиноподобной протсиназы 2 *B. intermedius* на колонке MonoS

I – A_{280}

II – градиент NaCl (0-0,5 M) в 15 мМ Na-ацетатном буфере рН 6,3, содержащем 0,5 мМ $CaCl_2$

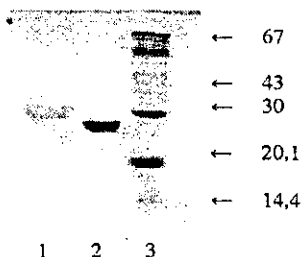


Рис. 5. Электрофорез внеклеточных щелочных протеиназ поздней стационарной фазы роста *B. intermedius* в ПААГ с DS-Na. 1 – субтилизиноподобная протеиназа;

2 – глутамилэндопептидаза; 3 – маркеры: бычий сывороточный альбумин (67 кДа), овалбумин (43 кДа), карбоксиангидраза (30 кДа), ингибитор трипсина (20,1 кДа), лизоцим (14,4 кДа)

Изоэлектрическая точка субтилизиноподобной протеиназы 2 соответствует рН 9,2 (табл.1).

Таблица 1

Физико-химическис свойства поздних протеиназ *B. intermedius* 3-19

Свойства	Глутамилэндопептидаза	Субтилизиноподобная протеиназа
Молекулярная масса (ЭФ), кДа	26,5	28
Изоэлектрическая точка	8,4	9,2
Оптимум рН по казеину	7,2 и 9,5	8,5
по синт. субстрату	8,5	9,0
рН-стабильность по синт. субстрату	7,2 – 9,5	7,2 – 9,5
Оптимум температуры (Ca ²⁺) по синт. субстрату, °	55	55
Термостабильность (Ca ²⁺) по синт. субстрату, °	37 - 50	22 - 45

Глутамилэндопептидазы устойчивы к действию различных ингибиторов. Активность глутамилэндопептидазы 2 подавляется ингибитором сериновых протсиназ — DFP. Другой ингибитор сериновых протеиназ - PMSF - оказывает незначительное влияние на активность фермента. Глутамилэндопептидаза 2 не чувствительна к бензамидину, ЭДТА и белковым ингибиторам, р-СМВ незначительно инактивирует фермент. Похожие результаты получены для глутамилэндопептидазы 1 [Leschinskaya et al., 1997].

При изучении влияния ингибиторов на активность субтилизиноподобной протеиназы 2 было показано, что специфические ингибиторы сериновых протсиназ PMSF и DFP полностью ингибируют, а ингибиторы нейтральных протеиназ ЭДТА,

о-фенантролин и ТЛСК не влияют на активность фермента. р-СМВ уменьшает активность протеиназы на 25%. Природные белковые ингибиторы по-разному влияют на активность субтилизиноподобной протсиназы 2: утиный овомукоид снижает активность на 70%, соевый ингибитор трипсина – на 25%, а ингибитор из морской анемоны не влияет на активность фермента (табл. 2). Похожие результаты были получены ранее для субтилизиноподобной протеиназы 1, секретируемой в ранней стационарной фазе роста клетками *B. intermedius*.

Таблица 2

Влияние ингибиторов на активность сериновых протеиназ поздней стационарной фазы роста *B. intermedius*

Ингибитор	Молярное соотношение фермент:ингибитор	Остаточная активность глутамилэндопептидазы, %	Остаточная активность субтилизиноподобной протеиназы, %
DFP	1:100	0	0
PMSF	1:100	84	0
TLCK	1:100	-	100
EDTA	1:100	100	100
о-фенантролин	1:100	-	100
р-СМВ	1:130	82	75
HgCl ₂	1:100	-	32
Утиный овомукоид	1:10	100	30
Ингибитор из морской анемоны	1:10	100	100
Соевый ингибитор трипсина	1:10	100	75

Таким образом, результаты исследования влияния ингибиторов на активность ферментов подтвердили, что поздние протеиназы *B. intermedius* относятся к классу сериновых протеиназ.

По физико-химическим свойствам глутамилэндопептидаза 2 похожа на глутамилэндопептидазу 1 и на ферменты того же типа, выделенные из других источников. Глутамилэндопептидаза 2 имеет один рН оптимум при гидролизе синтетического субстрата (8,5) и два рН оптимума при гидролизе казеина (7,2 и 9,5). До сих пор наличие двух рН оптимумов при гидролизе природного субстрата не объяснено в литературе. Фермент рН стабилен в том же диапазоне, что и другие глутамилэндопептидазы (7,2 – 9,5) [Руденская, 1998].

Температурный оптимум глутамилэндопептидазы 2, определенный по гидролизу синтетического субстрата, в отсутствие ионов Ca²⁺ равен 50°. В присутствии 5 мМ Ca²⁺ температурный оптимум смещается к 55°. Для глутамилэндопептидазы 1 показано, что в отсутствие Ca²⁺ равен 55°, в присутствии Ca²⁺ он смещается к 65°, и при этом повышается активность на 30% [Leschinskaya et al., 1997]. Глутамилэндопептидаза 2, также как и глутамилэндопептидаза 1, не теряет своей активности в интервале температур 37 - 50° в присутствии ионов Ca²⁺ после предварительного прогрева в течение двух часов. В отсутствие ионов Ca²⁺ в этих условиях теряется 50% активности.

Субтилизиноподобная протеиназа 2 проявляет максимальную активность при pH 9,0 на синтетическом субстрате и на казеине – 8,5. Фермент стабилен в интервале pH 7,2 – 9,5. Температурный оптимум соответствует 55°, активность фермента сохраняется в интервале температур 22 - 45° при наличии ионов Ca²⁺. Эти результаты полностью коррелируют с данными, полученными для других бактериальных ферментов [Степанов с соавт., 1980; Хайдарова с соавт., 1990].

Итак, наблюдаемые отклонения при сравнении энзиматических свойств ранних и поздних протеиназ практически не значительны.

Глутамилэндопептидаза при гидролизе синтетических тетрапептидов проявляет предпочтительную специфичность к связям, образованным остатками глутаминовой кислоты в положении P1 по сравнению с остатками аспарагиновой кислоты. Кроме того, в положении P2 наиболее предпочтительными являются связи, образованные остатками фенилаланина и метионина (табл. 3). Аналогичные результаты получены для глутамилэндопептидазы 1 *B. intermedius*. При исследовании специфичности протеаз из *B. licheniformis*, *S. griseus* и *S. aureus* такое же было показано, что ферменты гидролизовали связи Glu-Хаа в тысячу раз быстрее, чем связи Asp-Хаа [Breddam, Meldal, 1992].

Таблица 3

Гидролиз синтетических субстратов глутамилэндопептидазой *B. intermedius*

№	Субстрат	Активность, ед/мг
1	Z-Ala-Ala- Met-Glu-pNA	1,62
2	Z-Ala-Ala-Trp-Glu-pNA	0,75
3	Z-Ala-Ala-Phe-Glu-pNA	1,86
4	Z-Ala-Ala-Leu-Glu-pNA	1,12
5	Z-Gly-Ala-Ala-Glu-pNA	1,12
6	Z-Glu-pNA	0,51
7	Z-Ala-Ala-Trp-Asp-pNA	0,03
8	Z-Ala-Ala-Leu-Asp-pNA	0,05
9	Z-Ala-Ala-Phe-Asp-pNA	0,02
10	Z-Ala-Ala-Met-Asp-pNA	0,05
11	Z-Gly-Ala-Ala-Asp-pNA	0,02

Субстратная специфичность глутамилэндопептидазы 2 по гидролизу белковых субстратов аналогична таковой для глутамилэндопептидазы 1. Эти ферменты гидролизуют связи в А и В цепях окисленного инсулина не только по глутаминовой, но и по цистеиновой кислоте, которая образуется при окислении цистина (рис. 6).

Определение субстратной специфичности субтилизиноподобной протеиназы 2 по расщеплению В цепи окисленного инсулина показало, что фермент обладает широкой субстратной специфичностью – после гидролиза обнаруживается большое количество различных белковых фрагментов, кроме того, гидролиз идет гораздо глубже, чем у других ранее описанных субтилизиноподобных белков. Субтилизиноподобная протеиназа 2 активно гидролизует связи, образованные карбоксильными группами гидрофобных аминокислот лейцина, фенилаланина и тирозина (Leu11-Vall12, Leu15-Tyr16, Phe24-Phe25 и т.д.), а также гидрофильных аминокислот – серина, цистина, глутамна (рис. 7).

Для субтилизиноподобной протеиназы 1 получены похожие результаты. Таким образом, субстратная специфичность протеиназ поздней стационарной фазы роста *B. intermedius* не меняется на разных стадиях роста культуры и биосинтеза ферментов.

Аминокислотный состав глутамилэндопептидазы 2 близок к таковому для глутамилэндопептидазы 1. Анализ аминокислотной последовательности также показал наличие двух полуцистинов [Rebrikov et al., 1999]. N-концевая последовательность глутамилэндопептидазы 2 на протяжении десяти аминокислотных остатков полностью совпадает с глутамилэндопептидазой 1.

Определены аминокислотный состав и N-концевая последовательность субтилизиноподобной протеиназы 2. Молекула субтилизиноподобной протеиназы 2 состоит из 272 аминокислотных остатков и не содержит полуцистинов, что характерно для классических субтилизинов. N-концевые последовательности раннего и позднего ферментов на протяжении 10 аминокислот идентичны.

Таким образом, на основании сравнения физико-химических свойств протеиназ, синтезирующихся клетками *B. intermedius* в разные фазы развития культуры, влияния ингибиторов на активность ферментов, субстратной специфичности, аминокислотного состава и N-концевой последовательности можно заключить, что ферменты не полностью идентичны. Нами установлены различия в каталитических константах ранних и поздних протеиназ, причем ферменты поздней стационарной фазы роста активнее связывают и расщепляют субстрат по сравнению с ранними ферментами. Это можно объяснить тем, что на поздних стадиях роста, когда запас питательных веществ исчерпан, возрастает потребность в ферментах с высокой молекулярной активностью. N-концевые последовательности ранних и поздних ферментов идентичны, что предполагает идентичный фолдинг – то есть ранние и поздние белки являются продуктами экспрессии одного гена. В то же время выявленные различия в свойствах белков свидетельствуют о некоторых структурных отличиях. Учитывая идентичность N-концевых последовательностей ранних и поздних белков, можно предположить, что различия в свойствах ферментов обусловлены посттранскрипционной модификацией этих белков (ацетилированием, метилированием и др.).

Известно, что эукариотические клетки, а также клетки некоторых микроорганизмов, и в частности бацилл, способны к считыванию мРНК одного гена с различных промоторов [Erington, 1993; Loh et al., 1999]. К тому же в поздней стационарной фазе происходит изменение экспрессии генов, связанное со сменой основных сигма-факторов транскрипции, что отчасти может объяснить выявленные различия в аминокислотном составе исследованных ферментов поздней стационарной фазы роста по сравнению с ранними белками. Также на этот процесс может оказывать влияние вариабельность задействованных в биосинтезе стартовых кодонов.

В-цепь инсулина

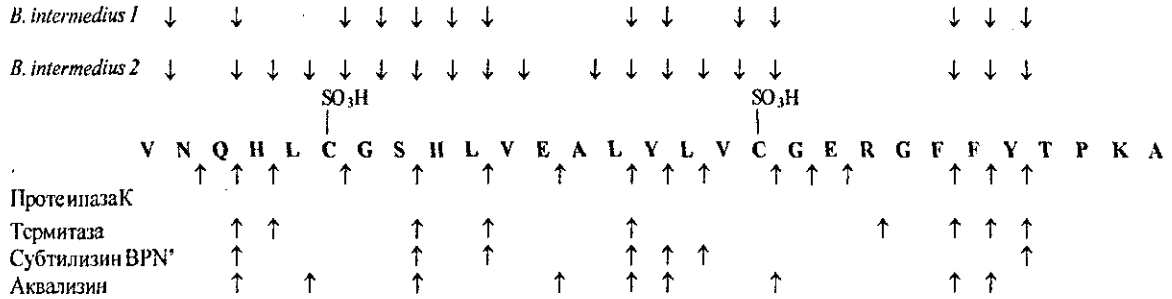


Рис. 7. Гидролиз В-цепи окисленного инсулина субтилизиноподобными протеиназами различного происхождения

Данные литературы свидетельствуют также о влиянии собственных антагонистических факторов, выделяемых микроорганизмами в фазе замедления роста, на транскрипцию мРНК, проявляющемся в посттранскрипционных изменениях аминокислотного состава белка, как это показано для *Tolypocladium sp.* [Сазыкин и Навашин, 1991]. Не исключено, что бактерии также выделяют антагонистические факторы со сходным механизмом действия.

Основной вывод, на наш взгляд, заключается в том, что глутамилэндопептидаза и субтилизиноподобная протеиназа поздней стационарной фазы роста *B. intermedius* претерпевают различные посттранскрипционные модификации.

Выводы

1. Подобран состав питательной среды для максимальной продукции протеиназ поздней стадии роста *B. intermedius*: для максимального выхода глутамилэндопептидазы среда культивирования должна содержать следующие компоненты (г/л): пептон – 19, неорганический фосфат – 0,3, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,55, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,5, NaCl – 3,0; для субтилизиноподобной протеиназы (г/л): пептон – 22, неорганический фосфат – 0,24, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,55, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,5, NaCl – 3,0, казеин – 1,0.
2. Из культуральной жидкости *B. intermedius* получены гомогенные препараты глутамилэндопептидазы 2 с удельной активностью 1,02 ед/ A_{280} и выходом 19,6% и субтилизиноподобной протеиназы 2 с удельной активностью 25,9 ед/ A_{280} и выходом 11%.
3. Исследовано влияние ингибиторов на активность глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы. Показано, что исследуемые ферменты по типу ингибирования относятся к классу сериновых протеиназ.
4. Определены энзиматические и каталитические свойства белков. Показано, что по энзиматическим свойствам протеиназы *B. intermedius* поздней фазы роста похожи на ферменты начала стационарной фазы роста, тогда как каталитические характеристики ранних и поздних ферментов *B. intermedius* отличаются.
5. Субстратная специфичность протеиназ поздней стационарной фазы роста *B. intermedius* не меняется на разных стадиях роста культуры и биосинтеза ферментов.
6. Определены аминокислотные составы и N-концевые последовательности глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы поздней стадии роста *B. intermedius*. Установлена 100% гомология N-концевых последовательностей соответствующих ферментов в ранней и поздней стационарной фазе роста бактерий.

Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Балабан Н.П. Протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемые в поздней стационарной фазе роста / Н.П. Балабан, А.М. Марданова, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, Ю.С. Токмакова, Е.А. Соколова, И.Б. Лещинская // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, серия Биология. – 2001. – Вып.3. – С. 45-50.
2. Габдрахманова Л.А. Факторы среды, влияющие на продукцию глутамилэндопептидазы стрептомицин-устойчивых штаммов *Bacillus intermedius* 3-19 / Л.А. Габдрахманова, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова, Ю.С. Токмакова, Е.А. Соколова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Микробиология. - 2002. - Т. 71. - №3. - С. 323-329.
3. Nelly P. Balaban, Proteinases from *Bacillus intermedius* secreted in the late stages of sporulation / Nelly P. Balaban, Leila A. Gabdrakhmanova, Margarita R. Sharipova, Evgeniya A. Sokolova, Galina N. Rudenskaya, Inna V. Leshchinskaya // Med Sci Monit. - 2002. - 8(5). - BR.168-171.
4. Балабан Н.П. Синтез и секреция протеиназ *Bacillus intermedius* на поздних стадиях спорообразования / Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, А.М. Марданова, Ю.С. Токмакова, Е.А. Соколова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Микробиология. - 2003. - Т. 72. - С. 338-342.
5. Балабан Н.П. Получение и характеристика глутамилэндопептидазы 2 *Bacillus intermedius* / Н.П. Балабан, А.М. Марданова, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, Е.А. Соколова, А.В. Гарусов, Е.И. Мильготина, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Биохимия. - 2003. - Т. 68. - С. 1514-1521.
6. Марданова А.М. Очистка и характеристика субтилизиноподобной сериновой протеиназы 2 *Bacillus intermedius* 3-19 / А.М. Марданова, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, Е.А. Соколова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Биохимия. - 2004. - Т. 69. - № 4. - С. 519-526.
7. Balaban N.P. Biosynthesis of serine proteinases of *B.intermedius* on the late stage of bacterial growth / L.A. Gabdrakhmanova, M.R. Sharipova, A.M. Mardanova, E.A. Sokolova, L.A. Malikova, I.B. Leshchinskaya // J. Basic Microbiol.- 2005. – V.44 - № 6. – P. 415-423.
8. Соколова Е.А. Оптимизация выделения внеклеточных протеиназ *Bacillus intermedius* 3-19, секретируемых бактериями в поздней стационарной фазе роста / Е.А. Соколова, Т.Р. Шамсутдинов, Н.П. Балабан // Вестник Казанского государственного университета. Принята в печать в апреле 2006 г.
9. Соколова Е.А. Биосинтез глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* рекомбинантными штаммами *Bacillus subtilis* / Е.А. Соколова, И.Е. Вишняков, Л.А. Габдрахманова // I Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета. – Казань, 2000. - С. 91-92.
10. Соколова Е. А. Выделение и характеристика щелочной протеиназы *Bacillus intermedius* / Е.А. Соколова, Ю.С. Токмакова // Материалы XXXIX международной научной студенческой конференции «Студент и научно-

- технический прогресс», посвященной 70-летию академика В.А. Коптюга. – Новосибирск, 2001. – С. 34-35.
11. Токмакова Ю.С. Протеиназы *Bacillus intermedius 3-19*, секретируемые в стационарной фазе роста / Ю.С. Токмакова, Е.А. Соколова, А.М. Марданова, Н.П. Балабан // XII Юбилейная конференция «Ферменты микроорганизмов». Сборник докладов. – Казань, 2001. – С. 61-62.
12. Соколова Е.А. Глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius 3-19* поздней стационарной фазы роста / Е.А. Соколова, А.М. Марданова, Н.П. Балабан // II Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета. – Казань, 2001. – С. 86.
13. Яхьяев А.М. Влияние компонентов питательной среды на продукцию субтилизина, секретируемого *Bacillus intermedius 3-19* на поздних стадиях спорообразования / А.М. Яхьяев, Е.А. Соколова, Н.П. Балабан // II Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета. – Казань, 2001. – С. 105.
14. Соколова Е.А. Выделение и характеристика внеклеточных субтилизинов *Bacillus intermedius 3-19* поздней стационарной фазы роста / Е.А. Соколова, А.М. Яхьяев, А.М. Марданова, Н.П. Балабан // I Форум молодых ученых и специалистов республики Татарстан. – Казань, 2001. — С. 8.
15. Балабан Н.П. Секретируемые протеиназы *Bacillus intermedius* поздней стационарной фазы роста / Н.П. Балабан, А.М. Марданова, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, Е.А. Соколова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // V симпозиум по химии протеолитических ферментов: Тез. докл. и стенд. сообщ. – Москва, 2002. - С. 48.
16. Шарипова М.Р. Глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* на разных фазах роста / М.Р. Шарипова, Н.П. Балабан, Л.А. Габдрахманова, А.М. Марданова, Е.А. Соколова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // V симпозиум по химии протеолитических ферментов: Тез. докл. и стенд. сообщ. – Москва, 2002. - С. 109.
17. Соколова Е.А. Субтилизины *Bacillus intermedius* поздней стационарной фазы роста / Е.А. Соколова, Н.П. Балабан // III Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета. – Казань, 2003 – С. 78.
18. Балабан Н.П. Получение и характеристика протеиназ *Bacillus intermedius 3-19*, секретируемых на поздних стадиях развития / Н.П. Балабан, А.М. Марданова, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, Е.А. Соколова, Г.Н. Руденская, Г.И. Эль-Регистан, И.Б. Лещинская // Тез. научн. докл. «III Съезд Биохимического общества». – Санкт-Петербург, 2002. - С. 593.
19. Соколова Е.А. Глутамилэндопептидаза *Bacillus intermedius* поздней стационарной фазы роста / Е.А. Соколова, Н.П. Балабан // Сборник тезисов докладов итоговой научной студенческой конференции 2002 года. - Казань, 2003. – С. 15.
20. Evgeniya A. Sokolova Serine proteinases from *Bacillus intermedius 3-19*, secreted at the late stationary phase of bacterial growth / Evgeniya A. Sokolova,

Nelly P. Balaban, Leila A. Gabdrakhmanova, Margarita R. Sharipova, Inna B. Leshchinskaya. // FEMS Congress of European Microbiologist «Bacillus-2003». - Ljubljana, Slovenia, 2003. – P. 17.

21. Рудакова Н.Л. Щелочные и нейтральные протеиназы *Bacillus intermedius* на поздних стадиях роста / Н.Л. Рудакова, Е.А. Соколова, Н.П. Балабан // Материалы XLII международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» секция биология. – Новосибирск, 2004. – С. 33.

22. Рудакова Н.Л. Протеиназы *Bacillus intermedius* на поздних стадиях роста / Н.Л. Рудакова, Е.А. Соколова, Н.П. Балабан // IV научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ «Материалы и технологии XXI века, Тезисы докладов. – Казань, 2004. – С. 66.

23. Рудакова Н.Л. Влияние компонентов питательной среды на биосинтез нейтральной протеиназы рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis JB 20-36 (met)* / Н.Л. Рудакова, Е.А. Соколова // Сборник тезисов 9-й международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2005. – С. 210.

24. Зайнетдинова А.Х. Влияние экзогенных факторов на продукцию глутамилэндопептидазы *Bacillus cereus* / А.Х. Зайнетдинова, Е.А. Соколова, Л.А. Габдрахманова // Тезисы Всероссийской молодежной школы-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии». – Москва, 2005. – С. 26 - 27.

Факс Казанского государственного университета
(843) 292-26-43

Подписано в печать 10.10.2006 г.
Форм. 60 x 84 1/16. Гарнитура «Таймс». Печать ризографическая.
Печ.л. 1,5. Тираж 100. Заказ 394.

Лаборатория оперативной полиграфии УМУ КГУ
420045 Казань, Кр. Позиция, 2а
Тел. 272-22-54

