

Изучение штаммов *Bacillus subtilis* с редуцированными геномами**Коробова Анна Владимировна**

Студент (бакалавр)

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

E-mail: ann-k17052000@ya.ru

Бактерии рода *Bacillus* широко используются для производства промышленных ферментов. Бациллы считаются многообещающими штаммами-хозяевами с многочисленными преимуществами, включая: нетоксичность, удобство модификации генов и высокий выход целевых белков и высокую скорость роста. Усложняет использование бацилл в качестве продуцентов их высокий уровень внеклеточных протеаз. В связи с чем, изучение и тестирование штаммов с редуцированными геномами для продукции гетерологичных белков является актуальной задачей биотехнологии. В настоящей работе были изучены штаммы *Bacillus subtilis* 27-24 и 27-39, в геноме которых инактивированы 20 и 72 гена соответственно, среди них гены ответственные за спорообразование, синтез антимикробных метаболитов, образование биопленок и внеклеточных протеиназ, а также встроена кассета *comK/comS* для повышения эффективности трансформации (любезно предоставлены проф. J. Altenbuchner). Данные штаммы получены методом CRISPR/Cas9 редактирования генома на основе модельного штамма *B. subtilis* 168. Он же был использован в качестве контрольного. Полученные данные станут основой для использования штаммов с редуцированными геномами в качестве штаммов-реципиентов для получения рекомбинантных белков.

Целью работы являлось изучение штаммов *Bacillus subtilis* с редуцированными геномами. Рабочая гипотеза заключается в том, что штаммы *Bacillus subtilis* с редуцированными геномами: 27-24 и 27-39 предположительно обладают меньшей внеклеточной протеолитической активностью по сравнению с контрольным штаммом *B. subtilis* 168, а также обладают полезными для использования в качестве продуцентов рекомбинантных белков свойствами, поскольку массивные делеции генома, в случае, если они не критичны для выживания в лабораторных условиях, позволяют этим штаммам использовать все доступные ресурсы для синтеза целевого белка.

В ходе работы было установлено, что штамм *B. subtilis* 168 и штаммы *B. subtilis* с редуцированными геномами 27-24 и 27-39 достигают максимальной оптической плотности к 15-18 часу. Стационарная фаза роста штамма *B. subtilis* 27-24 значительно короче, чем у *B. subtilis* 168. Максимальная внеклеточная протеолитическая активность *B. subtilis* 168 наблюдалась на 57 час роста культуры и составила 0.81 ед/мл. Для штамма *B. subtilis* 27-24 максимальная активность наблюдалась в стационарной фазе роста на 45 час и составила 0.3 ед/мл. В штамме *B. subtilis* 27-39 протеолитическая активность оставалась на уровне менее 0.5 ед/мл на протяжении всего роста. Максимальная фосфатазная активность в культуральной жидкости штамма *B. subtilis* 168 сохранялась на протяжении стационарной фазы роста, тогда как максимальная активность фосфатазы в культуральной жидкости штамма *B. subtilis* 27-24 наблюдалась на стадии отмирания (3.3 ед/мкл), для штамма 27-39 приходилась на середину стационарной фазы с 36 по 42 час роста (3.5 ед/мкл).

Таким образом, геномные делеции в штаммах *B. subtilis* 27-24 и 27-39 не существенно повлияли на рост культуры в лабораторных условиях, а более низкий уровень внеклеточных протеолитических и фосфатазных активностей указывает на то, что исследуемые штаммы

являются перспективными продуцентами целевых белков.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Иллюстрации

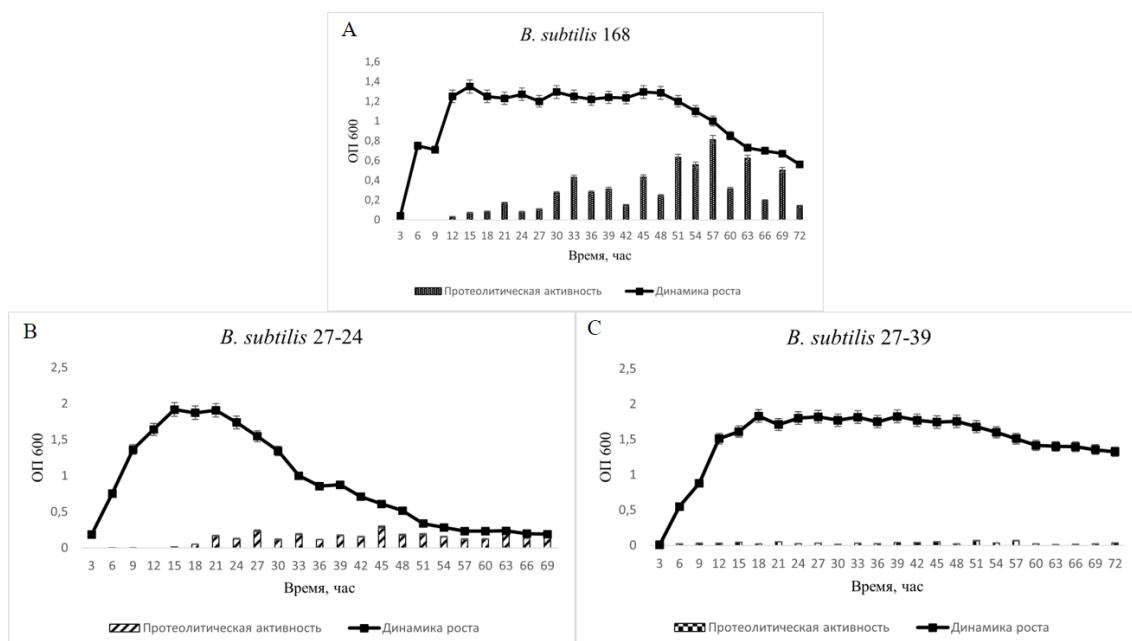


Рис. : 1 – Динамика роста и протеолитическая активность штаммов *B. subtilis*. А– динамика роста и протеолитическая активность контрольного штамма *B. subtilis* 168, ед/мл; В– динамика роста и протеолитическая активность *B. subtilis* 27-24, ед/мл; С– динамика роста и протеолитическая активность *B. subtilis* 27-39, ед/мл. Согласно тесту стьюдента, статистически значимые отличия существуют между А и Б при $p < 0.01$; между А и В при $p < 0.001$; между Б и В при $p < 0.001$.