

**Протеолитическая активность мутантных штаммов *B. pumilus* 3-19 с
делетированными генами антимикробных пептидов**

Васильева Юлия Александровна

Аспирант

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

E-mail: vasileva891@mail.ru

Ферменты представителей рода *Bacillus* имеют ключевое значение в современной биотехнологической индустрии. В частности, протеиназы бацилл, применяющиеся в области фармацевтической, сельскохозяйственной и пищевой промышленности. Данные ферменты эффективно гидролизуют пептидные связи внутри белковых соединений. Обладают устойчивостью в обширных диапазонах pH и температуры.

Многие физиологические процессы такие как спорообразование, конкурентная секреция поверхностных липопептидов и антимикробных метаболитов мешают использовать высокоэффективные штаммы рода *Bacillus*. Особенно выработка антимикробных пептидов во время ферментации может препятствовать внеклеточному продуцированию целевого белка. В связи с этим, мы предположили, что ресурсы клетки *B. pumilus* 3-19 будут использоваться более эффективно после инактивации генов антимикробных пептидов бацилизина и бактериоцина. Благодаря последним разработкам точная, эффективная и надежная система CRISPR-Cas9 часто применяется для данных целей. Комбинация различных регуляторных элементов позволяет адаптировать технологию под разные условия и задачи.

Для инактивации целевых генов бацилизина и бактериоцина в геноме *B. pumilus* 3-19 были созданы векторные конструкции, содержащие систему CRISPR/Cas9. Интеграцию спейсерных фрагментов в шаттл-вектор pJOE9282.1 проводили по сайту рестрикции BsaI. Фрагменты генов бацилизина и бактериоцина, полученные с геномной ДНК *B. pumilus* 3-19 встраивали в вектор по сайту SfiI. Клонирование полученных конструкций проводили в клетках *E. coli* DH5a. Целостность полученных плазмид подтверждали секвенированием. Полученные векторные конструкции трансформировали в клетки *B. pumilus* 3-19 методом электропорации. Целевую инактивацию генов выполняли на среде с добавлением ксилозы и антибиотика канамицина. Для предотвращения нецелевых эффектов инактивировали плазмиду с системой CRISPR/Cas9. Исследование динамики роста дикого и мутантных штаммов приводили в течение 83 часов. Внеклеточную протеолитическую активность определяли по расщеплению азоказеина.

Дикий штамм достиг максимального значения оптической плотности равного $OD_{590}=2.13$ на 37 час культивирования. Динамика роста штамма с инактивированным геном бацилизина была близка к динамике роста *B. pumilus* 3-19. Максимальное количество клеток было достигнуто на 33 час культивирования. Биомасса мутантного штамма с инактивированным геном бактериоцина была значительно ниже по сравнению с диким штаммом (в 1.4 раза) и достигла максимального значения оптической плотности на 27 час роста культуры. Протеолитическая активность исследуемых штаммов снизилась в 18,4 раза по сравнению с диким типом. Таким образом, можно сделать вывод, что при инактивации генов антимикробных пептидов секреция ферментов у *B. pumilus* 3-19 снижается.

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