УДК 579.852.11+577.151

ЗАКИСЛЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ ПРОДУКТАМИ МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ ПРЕПЯТСТВУЕТ СИНТЕЗУ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ α-АМИЛАЗЫ БАКТЕРИЯМИ *BACILLUS SUBTILIS* 168

© 2021 г. А. В. Качан^{1, *}, А. Н. Евтушенков¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, 220030 Беларусь *e-mail: av.kachan@mail.ru Поступила в редакцию 27.11.2020 г. После доработки 07.01.2021 г. Принята к публикации 22.02.2021 г.

Синтез α -амилазы AmyM3 из *Bacillus flexus* 406 в клетках рекомбинантного штамма *B. subtilis* 168-28 существенно подавлялся при глубинном культивировании бактерий в питательной среде с добавлением 1% глюкозы. Подавление синтеза α -амилазы глюкозой в клетках *Bacillus subtilis* происходило на уровне транскрипции при участии белка катаболитного контроля CcpA. Удаление предполагаемого участка *cre* в гене *amyM3* приводило к исчезновению эффекта катаболитной репрессии, однако количество синтезированной внеклеточной α -амилазы в присутствии глюкозы оставалось сниженным. Было показано, что сдвиг pH среды культивирования до значений 5.8–6.0, обусловленный метаболитами, выделяемыми бактериями *B. subtilis* при утилизации глюкозы, препятствовал синтезу активной внеклеточной α -амилазы, вероятно, оказывая влияние на пост-секреторный фолдинг фермента. Это наблюдение демонстрирует новый аспект обусловленного регулятором CcpA влияния *B. subtilis*.

Ключевые слова: Bacillus subtilis, альфа-амилаза, катаболиная репрессия, регуляция экспрессии генов, синтез экзоферментов

DOI: 10.31857/S0555109921040061

Микроорганизмы характеризуются избирательной утилизацией содержашихся в среде питательных субстратов, отдавая предпочтение веществам, подвергающимся катаболизму с меньшими энергетическими затратами, например, глюкозе. В присутствии легко метаболизируемого источника углерода происходит подавление экспрессии генов транспорта и утилизации других питательных субстратов. Такой способ регуляции метаболизма получил название катаболитной репрессии [1]. Катаболитный контроль подразумевает также активацию ряда генов, способствующих катаболизму предпочитаемого субстрата. Ключевую роль в катаболитном контроле экспрессии генов хорошо изученной почвенной бактерии *B. subtilis* играет глобальный транскрипционный регулятор СсрА. Данный белок семейства LacI/GalR активируется при повышении внутриклеточной концентрации фруктозо-1,6-бисфосфата, одного из первичных интермедиатов гликолитического расщепления глюкозы [2]. В присутствии глюкозы происходит активация регулируемой фруктозо-1,6-бисфосфатом протеинкиназы, фосфорилирующей белок HPr, который, после данной модификации, образует комплекс с СсрА. В комплексе с HPr СсрА связывается со специфическими участками, называемыми *cre* (<u>c</u>atabolite-<u>r</u>esponsive <u>e</u>lement), обнаруженными в более чем 60 регулируемых им оперонах. Под катаболитным контролем в клетках *B. subtilis* находятся гены ряда метаболических путей, дыхания, споруляции [3].

СсрА преимущественно действует в качестве репрессора транскрипции. В клетках *B. subtilis* 168 ген *атуЕ*, кодирующий α -амилазу (КФ 3.2.1.1), является мишенью репрессирующего действия белка СсрА. Регулятор связывается с последовательностью азотистых оснований 5'-TGT AAG CGC TTA CA-3', расположенной на 4 нуклеотида ниже области – 10 промотора, осуществляя репрессию транскрипции *атуЕ* в присутствии глюкозы [4]. Для некоторых оперонов *B. subtilis*, например, кодирующих ферменты превращения ацетил-КоА в ацетат, СсрА выступает в качестве активатора. Направленный мутагенез участков *сге* в генах биосинтеза биотехнологически значимых метаболитов позволяет повысить продуктивность бактерий при их выращивании в богатых углеводами питательных средах.

Ранее из хромосомной ДНК *Bacillus flexus* 406 был изолирован ген *amyM3*, кодирующий термостабильную α-амилазу AmyM3 [5]. После клонирования данного гена в клетках *B. subtilis* 168 бактерии эффективно синтезировали гетерологичный фермент.

Цель работы — охарактеризовать влияние катаболитного регулятора СсрА на синтез α-амилазы AmyM3 и получить мутантный вариант кодирующего ее гена, не чувствительный к катаболитной репрессии.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. Штамм бактерий Escherichia coli XL1-Blue (endA1 gyrA96(Nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ (lacZ)M15]

 $hsd R17(r_{k}^{-}m_{k}^{-}))$ был использован в работе для проведения молекулярного клонирования плазмидных векторов. Штамм бактерий *E. coli* TG-1 (K-12 glnV44 thi-1 Δ (lac-proAB) Δ (mcrB-hsdSM)5,

 $(r_{\kappa}^{-}m_{\kappa}^{-})$ F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15]) использовали для получения препаратов плазмидных ДНК перед трансформацией клеток *B. subtilis*. Штаммы E. coli XL1-Blue и TG-1, а также штамм B. subtilis 168 (trpC2) взяты из коллекции микроорганизмов кафедры молекулярной биологии Белорусского государственного университета (Минск). Штамм B. subtilis CR2 (trpC2 ccpA::er*mAM*(Em^R)) был получен замещением центральной части хромосомного гена ссрА бактерий B. subtilis 168 (trpC2) на маркерный ген устойчивости к эритромицину, для чего в клетки B. subtilis 168 вводили интегративную плазмиду pMTL21с*ссрА*-Ет. Штамм *B. subtilis* CR3 (*trpC2 ccpA::spc*(Sp^R)) был получен замещением центральной части хромосомного гена *ссрА* бактерий *B. subtilis* 168 (trpC2) на маркерный ген устойчивости к спектиномицину.

Штаммы *B. subtilis* 168-28 (*trpC2 amyE::[amyM3 aphA3*(Km^R)]) и 168-22 (*trpC2 amyE::[amyM3-cre1 aphA3*(Km^R)]) получены путем введения в клетки бактерий *B. subtilis* 168 интегративных векторов pMTL21c-*amyE-amyM3*-Km и pMTL21c-*amyE-amyM3-cre1*-Km соответственно.

Штаммы *B. subtilis* CR2-28 (*trpC2 ccpA::er-mAM*(Em^R) *amyE::[amyM3 aphA3*(Km^R)]) и CR2-22 (*trpC2 ccpA::ermAM*(Em^R) *amyE::[amyM3-cre1 aphA3*(Km^R)]) получены введением в клетки бактерий *B. subtilis* CR2 плазмид pMTL21c-*amyE-amyM3*-Km и pMTL21c-*amyE-amyM3-cre1*-Km со-ответственно.

Штаммы *B. subtilis* 168-MZ (*trpC2 amyE*::[P_{amyM3}*lacZ ermAM*(Em^R)]) и CR3-MZ (*trpC2 ccpA*::*spc*(Sp^R) *amyE*::[P_{amyM3}-*lacZ ermAM*(Em^R)]) получены введением в клетки бактерий *B. subtilis* 168 и CR3 соответственно плазмидной ДНК pMTL21с-*атуElacZ-атуM3*, которая позволяла встроить в состав кодирующей последовательности гена *атуE B. subtilis* репортерную конструкцию, обеспечивающую экспрессию гена β -галактозидазы (КФ 3.2.1.23) *lacZ E. coli* под контролем промоторного участка гена *атуM3*. Штамм *B. subtilis* 168-CZ (*trpC2 aтyE::* [P_{amyM3-cre1}-*lacZ ermAM*(Em^R)]) содержал аналогичную инсерцию, в которой в промоторном участке гена *атуM3* отсутствовал предполагаемый сайт *cre*.

В работе также использовался штамм *B. subtilis* 568 (*amyE::ermAM*(Em^R)), который был создан на основе *B. subtilis* 168 и содержал ген α -амилазы *amyE*, инактивированный путем инсерции маркера устойчивости к эритромицину.

Культивирование. Бактерии выращивали при температуре 37°С в полноценной жидкой или на агаризованной пептонно-дрожжевой среде следующего состава (г/л): пептон ферментативный -10.0, дрожжевой экстракт -5.0, NaCl -5.0, pH -7.0. Для оценки активности ферментов, синтезируемых различными штаммами B. subtilis, культивирование бактерий проводили в жидкой питательной среде для споруляции (ПСС) [6]. При выращивании в жидкой среде для аэрации и перемешивания культур (240 об./мин) использовали орбитальный шейкер IST-4075 ("Jeio Tech", Республика Корея). При необходимости в питательные среды вносили антибиотики в следующих концентрациях: ампициллин - 100 мкг/мл, канамицин – 50 мкг/мл, спектиномицин – 100 мкг/мл, эритромицин – 300 мкг/мл для E. coli и 3 мкг/мл для *B. subtilis*, хлорамфеникол – 5 мкг/мл для B. subtilis.

Измерение pH в питательных средах, растворах и отбираемых пробах бактериальных культур осуществляли с помощью pH-метра HI 83141 ("HANNA Instruments", Германия).

Конструирование интегративных плазмид. Для введения в состав хромосомной ДНК B. subtilis 168 чужеродных генетических конструкции были использованы интегративные плазмиды, полученные на основе вектора рМТС21с, не способного реплицироваться в клетках B. subtilis [7]. При создании плазмиды pMTL21с-ссрА-Ет проводили амплификацию фрагмента хромосомной ДНК В. subtilis 168, содержащего ген ссрА, в реакции ПЦР с олигонуклеотидами ссрF (5'-TTT TGC ТАG CAA TAT TAC GAT CTA CGA TGT A-3') и ccp-R (5'-TTC TCG AGT TAT GAC TTG GTT GAC TTT CTA AGC T-3'). Для проведения всех описанных в работе реакций ПЦР использовали амплификатор SureCycler 8800 ("Agilent Technologies", США), высокоточную ДНК-полимеразу Diamant HF и реагенты производства ОДО "Праймтех" (Беларусь). Реакционная смесь для

ПЦР объемом 50 мкл содержала около 50 нг тотальной ДНК B. subtilis 168, 0.2 ммоль/л каждого дНТФ, 0.5 мкмоль/л каждого праймера, 0.02 Е/мкл ДНК-полимеразы и соответствующий буфер. Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Целевые продукты очищали из геля с помощью набора Agarose Gel Extraction Kit ("Jena Bioscience", Германия), после чего полученный фрагмент ДНК объединяли в ходе реакции лигирования с плазмидой pMTC21с, предварительно линеаризированной с помощью эндонуклеазы рестрикции SmaI. После клонирования рекомбинантных молекул в клетках E. coli XL1-Blue верификацию получения нужных плазмил осушествляли с помошью рестрикционного анализа. Выделение плазмидной ДНК, электрофорез ДНК в агарозном геле, рестрикционный анализ и лигирование, кальциевую трансформацию клеток E. coli проводили в соответствии с обшепринятыми методиками [8]. В работе использовались препараты эндонуклеаз рестрикции и ДНК-лигазы фирм "Thermo Scientific" (Литва) и "New England Biolabs" (Великобритания).

После встраивания в состав вектора pMTL21c участка ДНК с геном *ссрА* полученную плазмиду обрабатывали эндонуклеазами *ClaI* и *Bsp*119I для удаления части кодирующей последовательности гена *ссрА*. Линейную плазмиду с делецией обрабатывали ДНК-полимеразой фага T4 ("Thermo Scientific", Литва) для создания ровных концов, после чего лигировали с фрагментом ДНК, содержащим маркер устойчивости к эритромицину, который был получен путем обработки плазмиды pMUTIN-4 [9] ферментами *XbaI*, *Sau3*AI и ДНК-полимеразой фага T4. Рекомбинантную плазмиду pMTL21c-*ссрА*-Ет клонировали в клетках *E. coli* XL1-Blue.

Трансформация бактерий *B. subtilis* плазмидной ДНК производилась по общепринятой методике [10]. После трансформации проводили отбор колоний, клетки которых проявляли устойчивость к эритромицину (что указывало на присутствие в геноме бактерий вставки pMTL21c-ccpA-Em, интегировавшейся в состав локуса ссрА путем гомологичной рекомбинации), при этом были чувствительными к хлорамфениколу (маркер устойчивости к которому присутствует в плазмиде pMTL21c). Такой фенотип указывал на то, что в клетках происходила двойная рекомбинация, в результате которой участок хромосомного гена ссрА замещался на поврежденную копию ссрА, при этом последовательность плазмиды pMTL21с в хромосому не внедрялась. Наличие в отобранном штамме *B. sub*tilis CR2 данной генетической перестройки подтверждали с помощью ПЦР на матрице геномной ДНК штамма с праймерами сср-F и сср-R по образованию единственного продукта реакции длиной 2061 п.н., в то время как размер амплифицируемого участка ДНК *B. subtilis* 168 в аналогичной реакции составлял 1017 п.н.

Аналогичная стратегия была использована для конструирования других использованных в работе интегративных плазмид и получения с их помощью рекомбинантных штаммов B. subtilis. Плазмиды pMTL21c-amyE-amyM3-Km и pMTL21c-amyE*атуМ3-сге1-*Кт обеспечивали инсерцию в состав локуса *атуЕ* маркера устойчивости к канамицину из векторной молекулы pKS1 [11] и гена α-амилазы атуМЗ В. flexus 406 [5]. Плазмида pMTL21c-атуЕ*атуМ3-сге1-*Кт позволяла интегрировать в локус *amvE B. subtilis* 168 мутантный вариант гена с делецией предполагаемого участка сге. Полученные с использованием данных плазмид штаммы B. subtilis 168-28, 168-22, CR2-28 и CR2-22 содержали ген amyM3 в составе хромосомного локуса amyE. Такая инсерция приводила к инактивации гена amyE, кодирующего собственную α -амилазу B. subtilis 168.

Благодаря полученной в работе плазмиде pMTL21c-amyE-lacZ-amyM3 производилась интеграния в состав колирующей последовательности гена *amyE B. subtilis* репортерной конструкции, обеспечивающей экспрессию гена β-галактозидазы lacZ E. coli (изолирован из плазмиды pMUTIN-4) под контролем промоторного участка гена *атуМ3*. Репортерный вектор получали путем встраивания в состав плазмиды pMTL21сатуЕ фрагментов из плазмиды pMUTIN-4, содержащих маркер устойчивости к эритромицину и ген lacZ. Затем полученную плазмиду линеаризировали обработкой ферментом Smal. Промоторный участок атуМЗ получали путем амплификации в реакции ПЦР с использованием плазмиды pALTER-1-*атуМ3* в качестве матричной ДНК и олигонуклеотидов срт-F (5'-CGA TCG CCT ATT TGG CTT TTC CCC ATT CGC TAC TTC GAA AAA GCA GG TAG C-3') и cpm-R (5'-GAT CCG CGG CGG CCG CCC ATG ATT CGG TGC ААС СGT TGG САС-3'). Объединение промоторного участка гена атуМЗ с линейным интегративным вектором проводили с помощью методики кольцевой полимеразной реакции (СРЕС) [12]. Реакционная смесь объемом 60 мкл включала 10 нг/мкл фрагмента гена *атуМЗ*, 10 нг/мкл линеаризированного вектора, 0.2 ммоль/л каждого дНТФ и 0.02 Е/мкл ДНК-полимеразы. Реакцию осуществляли при следующем температурном режиме: 98°С 30 с; 20 циклов: 98°С 10 с, 70°С 30 с, 72°С 5 мин; 72°С 10 мин. Аналогичным образом в работе была сконструирована плазмида рМТL21с-атуЕ-lacZ-атуМЗ-сге, содержащая ген *lacZ* под контролем промотора *amyM3* с мутацией предполагаемого участка сге. Репортерные конструкции вводились в клетки штаммов B. subtilis 168 и CR2, с последующим отбором содержащих инсерции в локус атуЕ бактерий. Полученные штаммы B. subtilis 168-MZ, B. subtilis 168-CZ и CR3-MZ характеризовались отсутствием амило-

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ



Рис. 1. Продуктивность (среднее значение $E/D_{600} \pm \sigma$) различных штаммов *B. subtilis* по α -амилазе: I, II – 168-28; III, IV – CR2-28; V, VI – 168-22; VII, VIII – CR2-22. В культуры I, III, V, VII глюкозу не вносили, в культуры II, IV, VI и VIII вносили глюкозу до концентрации 1.0% в середине экспоненциальной фазы. Активность фермента оценивали непосредственно после внесения в культуры глюкозы (*I*) или через 1 (*2*) 2 (*3*), 3 (*4*), 5 (*5*) и 7 (*6*) ч после этого.

литической активности, устойчивостью к эритромицину и чувствительностью к хлорамфениколу.

Направленный мутагенез предполагаемого участка *cre* гена *атуМ3* проводили с помощью набора Altered Sites® II *in vitro* Mutagenesis System ("Promega Corp.", США) в соответствии с рекомендуемым производителем протоколом. Наличие изменений в последовательности ДНК подтверждали с помощью секвенирования.

Определение концентрации D-глюкозы в бактериальных культурах проводили глюкозооксидазным-пероксидазным методом с использованием набора D-glucose assay kit (GOPOD-Format) ("Megazyme", Ирландия).

Оценку накопления α -амилазы в культуре бактерий осуществляли, выращивая штаммы до середины экспоненциальной фазы в среде ПСС, после чего культуры разделяли на две части, в одну из которых вносили раствор D-глюкозы до конечной концентрации 1% [6]. В течение дальнейшего культивирования в периодически отбираемых пробах культуры оценивали количество клеток по величине оптической плотности при длине волны 600 нм, а также измеряли активность внеклеточных α -амилаз с реагентом I₂/KI, как описано [6]. Продуктивность клеток выражали в виде отношения рассчитанных значений активности к значению D₆₀₀ культуры (E/D₆₀₀).

Оценку активности гена β-галактозидазы *lacZ* в пробах выращенных аналогичным образом бак-

териальных культур проводили в соответствии с широко используемой методикой [13].

Статистический анализ данных. Все данные представляют собой средние значения, полученные по результатам по меньшей мере трех независимых экспериментов. Статистическая обработка результатов измерений проводилась в программе Microsoft Office Excel 2003. Погрешность измерений оценивали по величине среднеквадратичного отклонения (σ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При выращивании в жидкой питательной среде ПСС бактерии штамма B. subtilis 168-28 вступали в стационарную фазу роста на 2-3 ч после начала отбора проб в середине экспоненциальной фазы. Внесение глюкозы до концентрации 1.0% в этой фазе роста культуры вызывало задержку в достижении стационарной фазы. При оценке количества α-амилазы в культуре бактерий B. subtilis 168-28, выращиваемых в данных условиях, было обнаружено, что активность фермента через 3 ч после внесения в культуру глюкозы составляла около 5% от активности фермента в культуре без глюкозы, как показано на рис. 1. Было выдвинуто предположение, что в клетках B. subtilis 168-28 ген атуМЗ подвергается катаболитной репрессии по механизму, характерному для гена *атуЕ*, т.е. обусловленному транскрипционным регулято-

351	TCAGCTAACACCTGAAAATATTCGCTACTTCGAAAAAGCAGGTAGCGAACCTTGGAAGAGTTATAATCCT
421	TTAAAAAGCTCAAAAAAATTCTTGGGGTTTTAGCTTTAGCTTTATAGTCAAAAAG
491	CTGATGAATTTTTATTTTTTTAAAAAACTAGATAACTTTCTTT
561	TT <u>TATTGT</u> TCATCTCTAAACCCTCTTT <mark>TGGTAACGTTTACA</mark> AAAAAGTGA <u>AGGGGATGG</u> AAAT <mark>GTGAGAA</mark>
631	CAAAAAGTTCAAGAACATGGTTTAGTTTACTTCTTGCTTTATTGATTTTTGTGCCAACGGTTGCACCGAA
701	TCATAAAGCGGAAGCAGCAGCGCAAAAACGGAACGATGATGCAATACTTTGAATGGTACGTGCCCAATGAT
771	GGCCAACACTGGAACCGATTGCGCAATGATGCGGCATACTTAAAAAGCATAGGTGTTTCGGCTGTTTGGA
841	CACCTCCTGCTTATAAAGGTACAAGCCAAAATGATGTTGGATATGGCGCTTATGATCTCTATGATTTAGG
911	AGAATTCAATCAAAAAGGAACGATTCGAACAAAGTACGGAACAAAAGCAGAATTAAAATCAGCGGTTAGT
981	ACTCTCAAATCAAACGGCATTCAAGTATATGGAGATGTCGTTATGAATCATAAAGGTGGCGCTGACTATA
1051	C TGAAAACGTAACAGCAGTTGAAGTAAACCCTTCTAACCGAAATCAAGAAACTTCAGATGAATATACCAT
1121	CCAAGCGTGGACTGGCTTTAACTTTCCAGGTCGCGGGACTACGCACAGTCCATTTAAATGGCAGTGGTAT
1191	CATTTTGATGGAACGGACTGGGATCAATCACGAAACGCCAGCCGCATTTTTAAATTCCGTGGAACAGGAA
1261	AAGCGTGGGACTGGGAAGTATCAAGTGAAAACGGCAACTATGATTATTTAATGTATGCTGACCTTGATTT
1331	TGATCACCCCGATGTTGGGAACGAAATGAAGAACTGGGGCGTATGGTACGCAAACGAAGTCGGCTTAGAC
1401	GGCTTTCGCTTAGACGCAGTGAAACATATTAAGCATTCCTACTTAGGGGATTGGGTCAACCATGTTCGTA
1471	CGAAAACCGGAAAAGAAATGTTTACAGTGGCAGAGTACTGGCAAAACGATGTGAATGCCATTAATAACTA
1541	CCTAGCAAAGGTAAACTATAACCATTCTGTCTTTGATGCACCTCTTCACTACAATTTCCATTATGCTTCT
1611	CAGTCTGGTGGAAATTACGATATGAGAAATTTATTAAACGGAACGGTTGTTGCTGCACACCCAACAAAGG
1681	CCGTAACGTTAGTTGAAAATCACGATTCACAGCCAGGTCAGTCCCTAGAATCCGTTGTACAGCCTTGGT
1751	TAAACCGCTAGC <mark>CTATGCGTTTATCCTAACACGAGCAGAAGGTTACCCAAGCAT</mark> ATTTTACGGTGACA <mark>TG</mark>
1821	TACGGTACAAAAGGAAACAGTTCATATGAGATCCCAGCTTTAAAAACAAAGATAGAGCCTCTATTAAAAG
1891	CTCGTAAAGATTACGCATACGGTACGCAGCACAATTATATGGACCACTGGGACGTAATTGGCTGGACGCG
1961	AGAAGGAGACAGCACAAAAGAAAAATCTGGTCTCGCAACGCTTGTTACAGATGGAGCTGGCGGATCAAAA
2031	TGGATGTATGTTGGAAAACAAAACGCTGGTGAGGTTTGGTACGACATTACAGGTAATCGAACAGATAAGA
3101	TTACGATTAATACAGATGGATGGGGGAATTTCCAAGTAAACGGTGGATCCGTATCTGTTTACGGTCAGCA
2171	ATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Рис. 2. Результаты поиска областей *cre* в гене *атуМ3* с помощью программы FIMO. Подчеркнуты предполагаемые промотор и RBS-сайт, в рамке – кодирующая последовательность гена. Черным фоном выделена наиболее вероятная последовательность *cre*, серым – менее вероятные.

ром СсрА. Это предположение подтверждалось тем, что в культуре бактерий *B. subtilis* CR2-28, у которых ген ссрА был инактивирован, активность α-амилазы продолжала увеличиваться несмотря на присутствие глюкозы в среде культивирования. Через 3 ч культивирования как в среде ПСС с глюкозой, так и без глюкозы в культуре B. subtilis CR2-28 регистрировали сопоставимые уровни амилолитической активности (около 23 Е/D₆₀₀). Через 5 и 7 ч после внесения в культуру глюкозы бактерии продолжали активно синтезировать фермент (активность 53.3 \pm 3.2 и 74.9 \pm 6.7 E/D₆₀₀ соответственно), в то время как в культуре, в которую глюкозу не добавляли, через 5 и 7 ч культивирования прирост активности снижался (активность 34.6 ± 3.7 и 41.4 ± 6.7 E/D₆₀₀ соответственно).

Для поиска участков связывания белка СсрА в нуклеотидной последовательности гена *атуМ3* с помощью базы данных DBTBS был получен спи-

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

сок 44 участков сте, функциональное значение которых в регуляции различных генов и оперонов B. subtilis 168 было подтверждено экспериментально [14]. В программе FIMO [15] было осуществлено сканирование нуклеотидной последовательности гена *атуМ3* (код доступа в Genbank: JX429073.1) полученной консенсусной последовательностью сге. В результате анализа в последовательности гена атуМЗ было обнаружено 14 участков, проявляющих сходство с последовательностью *cre* (*p* < 0.001). Результаты поиска представлены на рис. 2. Наибольшее подобие с консенсусом последовательности cre B. subtilis обладал участок 5'-TGG ТАА ССТ ТТА СА-3', который локализовался в положении 588-601 проанализированной последовательности гена атуМЗ, между областью – 10 предполагаемого промотора гена и последовательностью Шайна-Дальгарно, как показано на рис. 2. Такое расположение соответствует локализации участков сте во многих генах,

том 57 № 4 2021



Puc. 3. Активность гена β-галактозидазы (среднее значение E Миллера $\pm \sigma$), находящегося под контролем различных вариантов промотора гена *amyM3*, в клетках различных штаммов *B. subtilis*: I, II – 168-MZ; III, IV – 168-CZ; V, VI – CR3-MZ. В культуры I, III, V глюкозу не вносили, в культуры II, IV и VI вносили глюкозу до концентрации 1.0% в середине экспоненциальной фазы. Измерения проводили непосредственно после внесения в культуры глюкозы (*I*) или через 1 (*2*), 2 (*3*), 3 (*4*), 4 (*5*) и 5 (*6*) ч после этого.

для которых подтверждена регуляция белком СсрА [3]. Значительное сходство с консенсусом наблюдалось как на прямой, так и на обратной цепи ДНК в положении 588-601, что указывает на выраженную палиндромную структуру этого участка. Менее четким сходством с консенсусной последовательностью сте обладали 5 участков, расположенных внутри кодирующей последовательности гена (координаты 682-695, 703-716, 780-793, 1052-1065 и 1286-1299 на рис. 2). Другие выявленные участки не имели ряда важных структурных особенностей, характерных для областей cre B. subtilis, например, консервативной пары CG, либо располагались на значительном расстоянии от точки старта транскрипции, поэтому их роль в зависимой от белка СсрА репрессии гена атуМЗ маловероятна.

Чтобы определить, задействован ли обнаруженный участок 5'-TGG TAA CGT TTA CA-3' в регуляции активности гена α-амилазы, осуществляемой СсрА, был проведен его направленный мутагенез, в результате которого вышеуказанная 14-нуклеотидная последовательность была заменена на сайт узнавания эндонуклеазы *SpeI* 5'-ACT AGT-3'. Мутантный вариант гена *amyM3* с удаленным таким образом предполагаемым участком *cre* внедряли в состав хромосомного локуса *amyE* бактерий *B. subtilis*, имеющих как функциональный, так и инактивированный ген *ccpA*. В результате были получены штаммы *B. subtilis* 168-22 и CR2-22 соответственно.

Результаты оценки активности α-амилазы в культурах бактерий *B. subtilis* 168-22 и CR2-22 приведены на рис. 1. В культуре *B. subtilis* CR2-22 динамика накопления внеклеточной α-амилазы существенно не отличалась от характерной для штамма B. subtilis CR2-28. Продуктивность клеток бактерий *B. subtilis* 168-22 по α-амилазе в присутствии глюкозы была низкой (4.64 \pm 0.42 E/D₆₀₀), хотя в первые 2 ч после внесения глюкозы она была значимо больше, чем в культуре штамма B. subtilis 168-28, имеющего нативную последовательность гена *атуМЗ* ($2.28 \pm 0.51 \text{ E/D}_{600}$). Был сделан вывод, что подавление синтеза фермента глюкозой обусловлено фактором СсрА, однако регулятор либо действует через связывание с другим участком гена атуМЗ, либо может оказывать опосредованное влияние через иные факторы.

Чтобы детальнее изучить влияние регулятора СсрА на функционирование гена α -амилазы АтуМЗ, в хромосомы бактерий *B. subtilis* 168 и СRЗ вводилась репортерная конструкция, содержащая кодирующий β -галактозидазу ген *lacZ*, выше которого был встроен фрагмент ДНК, содержащий промоторный участок гена *атуМЗ* либо этот промотор с мутацией предполагаемого участка *cre*. Оценка активности β -галактозидазы в клетках по-



Рис. 4. Значение pH (среднее значение $\pm \sigma$) среды ПСС (а) и остаточная концентрация глюкозы (среднее значение $\% \pm \sigma$, б) при культивировании бактерий *B. subtilis* 168-28 (*1*, *3*) и CR2-28 (*2*, *4*) в присутствии 1% глюкозы (*1*, *2*) или без ее добавления (*3*, *4*). Измерения проводили каждый час, начиная с момента внесения в культуры глюкозы.

лученных штаммов B. subtilis 168-MZ, 168-CZ и CR3-CZ показала, что промотор гена *атvM3* наиболее эффективно инициировал транскрипцию в начале стационарной фазы роста культуры, после чего активность гена постепенно снижалась. Как видно на рис. 3, при внесении в культуру глюкозы наблюдалось практически полное подавление активности нативного промотора, однако промотор с мутацией в предполагаемом участке сте обеспечивал повышенный уровень транскрипции генарепортера при добавлении в среду культивирования глюкозы. Соизмеримо высокая активность гена lacZ, находящегося под контролем нативного промотора amvM3, обнаруживалась и в клетках штамма, имеющего инактивированный ген ссрА. Полученные результаты свидетельствуют о том, что белок СсрА контролирует инициацию транскрипции в промоторе гена *атуМ3*, при наличии глюкозы подавляя экспрессию гена путем контакта с участком сге, имеющим нуклеотидную последовательность 5'-TGG TAA CGT TTA CA-3'.

Интересен тот факт, что при внесении в культуру глюкозы, несмотря на сохранение высокой активности промотора *amyM3* с делецией участка *cre*, у штамма *B. subtilis* 168-22, содержащего ген с данным промотором, синтез внеклеточной α-амилазы существенно подавляется. Известно, что метаболизм глюкозы клетками *B. subtilis* 168 происходит путем гликолиза с последующим окислительным декарбоксилированием пирувата. Конечный продукт этого процесса, ацетил-КоА, превращается в силу "эффекта избыточного метаболизма (overflow metabolism)" преимущественно в ацетат. Регулятор СсрА выступает активатором соответствующих генов, одновременно блокируя гены метаболизма ацетил-КоА в цикле трикарбоновых кислот. Уксусная кислота, а также пируват, ацетоин и 2,3-бутандиол выделяются клетками во внешнюю среду в качестве основных побочных продуктов утилизации глюкозы [16, 17]. В работе была проведена оценка изменения рН питательной среды в ходе культивирования бактерий B. subtilis 168-28 и CR2-28 в среде ПСС с 1.0% глюкозы. Результаты, представленные на рис. 4, подтверждали известные из литературы факты, что утилизация бактериями глюкозы приводила к интенсивному выделению в среду культивирования кислот, приводя к сдвигу значения рН культуры до 5.8-6.0 через 2 ч после добавления углевода [18]. Закисления среды при культивировании штамма, дефектного по гену ссрА, практически не наблюдалось, что может объясняться нарушением регуляции экспрессии ряда генов углеводного и азотного обмена, находящихся под контролем СсрА [19]. Как показано на рис. 4, за 5 ч культивирования количество глюкозы в культурах штаммов B. subtilis 168-28 и CR2-28 снижается до 0.7 и 0.86% соответственно.

Полученные результаты позволяют предположить, что низкие значения внеклеточной амилолитической активности при культивировании бактерий *B. subtilis* 168-22 в среде с глюкозой обусловлены фактором СсрА, однако не прямой репрессией гена α -амилазы, лишенного участка *сге* (транскрипция гена в клетках данного штамма в среде с глюкозой сохранялась на высоком уровне), а опосредовано, через снижение pH среды культивирования продуктами утилизации углевода. Чтобы подтвердить наличие такого влияния, бактерии *B. subtilis* 168-22 и *B. subtilis* CR2-22



Рис. 5. Продуктивность (среднее значение $E/D_{600} \pm \sigma$) штаммов *B. subtilis* 168-22 (I–V), CR2-22 (VI–X) по α -амилазе в условиях сдвига рН. В культуры II, V, VII и X вносили глюкозу до концентрации 1.0% в середине экспоненциальной фазы. В культуру V также вносили 2 M NH₄OH для поддержания значения рН 7.5. Для поддержания значения рН 5.9 в культуры III и VIII вносили 0.5 М уксусную кислоту, в культуры IV, IX, X – 1 М HCl. XI – культура *B. subtilis* 568 с добавлением 40 Е/мл АтуМЗ, в которую вносили 1 М HCl для поддержания значения рН 5.9. Активность амилаз измерена непосредственно после внесения в культуры глюкозы (1) или через 1 (2), 3 (3) и 5 (4) ч после этого.

культивировали в питательной среде ПСС, периодически внося в нее раствор, содержащий 0.5 М ацетата или 1 М НСІ в таких количествах, чтобы обеспечить снижение рН среды культивирования до значений 5.8-6.0, соответствующих наблюдаемым в содержащей глюкозу среде. Для оценки стабильности α-амилазы АтуМ3 в такой среде в культуру бактерий *B. subtilis* 568, не способных синтезировать α-амилазу, фермент вносили до концентрации 40 Е/мл. Представленные на рис. 5 результаты показывают, что подавление синтеза α-амилазы бактериями B. subtilis 168-22 происходило как при утилизации глюкозы, в ходе чего происходит снижение рН внеклеточной среды до 5.8-6.0 (рис. 4), так и при внесении в культуру уксусной или соляной кислоты. В культурах штамма B. subtilis CR2-22, клетки которого лишены регулятора СсрА, необходимого для выделения кислот, образующихся при метаболизме глюкозы, синтез внеклеточной амилазы также мог быть блокирован доведением рН до 5.8-6.0. С другой стороны, смещение рН до значения 7.5, производимое путем внесения 2 М раствора гидроксида аммония, при выращивании *B. subtilis* 168-22 в среде ПСС с глюкозой позволяло восстановить накопление амилолитической активности в среде культивирования, что служило доказательством влияния рН среды культивирования на синтез внеклеточной α-амилазы.

Следует отметить, что инактивация внесенного в культуру *B. subtilis* 568 фермента в анализируемых условиях была незначительной, рассчитанное время полуинактивации α -амилазы в такой культуре составляло около 10 ч. Оптимум активности данного фермента ранее был определен в диапазоне значений pH от 6.0 до 7.0.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что катаболизм глюкозы до

кислотных продуктов, контролируемый при участии транскрипционного фактора СсрА, и закисление ими культуральной жидкости препятствует синтезу внеклеточной α -амилазы AmyM3 бактериями *B. subtilis*. Это объясняет, почему бактерии, имеющие ген *атуM3* с удаленным участком *cre*, выделяли лишь незначительные количества α -амилазы в культуре с добавлением глюкозы.

Анализ приведенных наблюдений позволяет предположить, что чувствительность α-амилазы AmyM3, синтезируемой клетками *B. subtilis* 168, к кислому рН среды проявлялся на стадии транслокации через мембрану либо пост-транслокационного фолдинга. Известно, что многие гетерологичные α -амилазы, синтезируемые в клетках *B. subtilis* 168, как и ряд других внеклеточных ферментов, секретируясь в развернутом виде, подвергаются внеклеточному фолдингу с участием липопротеина PrsA [20]. Затруднения на этапе принятия секретируемыми белками нативной третичной структуры, обычно связанные с их сверхпродукцией или отсутствием необходимых для фолдинга факторов, приводят к накоплению несвернутых полипептидов в просвете между мембраной и клеточной стенкой. В клетках B. subtilis это инициирует секреторный стресс, сопровождающийся повышенной экспрессией генов мембранных протеаз HtrA и HtrB, которые обеспечивают деградацию дефектных белков [21]. В исследовании Манабэ с соавт. было показано, что одним из факторов, влияющих на внеклеточный фолдинг шелочной α-амилазы АтуК38, является значение внеклеточного рН – смещение рН среды культивирования бактерий с 6.8 до 8.4 приводило с существенному повышению уровня внеклеточной активности α-амилазы и снижению экспрессии маркеров секреторного стресса [22]. Вероятно, фолдинг αамилазы AmyM3, выделяющейся из клеток B. sub*tilis*, также нарушается при снижении pH до значений 6.0.

Обнаруженное влияние низких значений pH среды культивирования на способность бактерий *B. subtilis* выделять функциональную α -амилазу является еще одним аспектом действия регулятора СсрА, активирующегося при утилизации клет-ками легко метаболизируемых углеводов, на продукцию внеклеточной α -амилазы бактериями *B. subtilis*. Данное влияние следует учитывать в процессах ферментации, при использовании богатых углеводами питательных сред для выращивания штаммов-продуцентов внеклеточных белков.

Дальнейшие исследования позволят детальнее понять, что происходит с α-амилазой AmyM3 после секреции и какие генетические изменения клеток *B. subtilis* могут уменьшить негативный эффект внеклеточного pH на синтез этого фермента.

Работа выполнялась в рамках задания государственной программы научных исследований "Биотехнологии" за 2018—2020 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Deutscher J.* // Curr. Opin. Microbiol. 2008. V. 11. № 2. P. 87–93.
- Fujita Y. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2009. V. 73. № 2. P. 245–259.
- Lorca G.L., Chung Y.J., Barabote R.D., Weyler W., Schilling C.H., Saier Jr. M.H. // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 22. P. 7826–7839.
- 4. *Weickert M.J., Chambliss G.H.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 16. P. 6238–6242.
- Kachan A.V., Evtushenkov A.N. // Cent. Eur. J. Biol. 2013. V. 8. № 4. P. 346–356.
- Nicholson W.L., Chambliss G.H. // J. Bacteriol. 1985. V. 161. № 3. P. 875–881.

- 7. Chambers S.P., Prior S.E., Barstow D.A., Minton N.P. // Gene. 1988. V. 68. № 1. P. 139–149.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Ред. А.А. Баев, К.Г. Скрябин. М.: Мир, 1984. 480 с.
- 9. Vagner V., Dervyn E., Ehrlich S.D. // Microbiology. 1998. V. 144. № 11. P. 3097–3104.
- 10. Spizizen J., Anagnostopoulos C. // J. Bacteriol. 1961. V. 81. № 5. P. 741–746.
- 11. *Shatalin K., Neyfakh A.* // FEMS Microbiol Lett. 2005. V. 245. № 2. P. 315–319.
- Кулик Е.В., Селезнева Ю.В., Качан А.В., Русь О.Б., Евтушенков А.Н. // Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук. 2020. Т. 65. № 3. С. 319-327.
- 13. Ferrari E., Howard S.M., Hoch J.A. // J. Bacteriol. 1986. V. 166. № 1. P. 173–179.
- Sierro N., Makita Y., de Hoon M., Nakai K. // Nucl. Acids Res. 2008. V. 36. P. D93–D96.
- 15. *Grant C.E., Bailey T.L., Noble W.S.* // Bioinformatics. 2011. V. 27. № 7. P. 1017–1018.
- Speck E.L., Freese E. // J. Gen. Microbiol. 1973. V. 78. № 2. P. 261–275.
- Blencke H.-M., Homuth G., Ludwig H., M\u00e4der U., Hecker M., St\u00fclke J. // Metab. Eng. 2003. V.5. № 2. P. 133–149.
- Turinsky A.J., Moir-Blais T.R., Grundy F.J., Henkin T.M. // J. Bacteriol. 2000. V. 182. № 19. P. 5611–5614.
- Sonenshein A.L. // Nat. Rev. Microbiol. 2007. V. 5. № 12. P. 917–927.
- Vitikainen M., Hyyryläinen H.-L., Kivimäki A., Kontinen V.P., Sarvas M. // J. Appl. Microbiol. 2005. V. 99. № 2. P. 363–375.
- Hyyryläinen H.-L., Bolhuis A., Darmon E., Muukkonen L., Koski P., Vitikainen M., Sarvas M., Prágai Z., Bron S., van Dijl J.M., Kontinen V.P. // Mol. Microbiol. 2001. V. 41. № 5. P. 1159–1172.
- Manabe K., Kageyama Y., Tohata M., Ara K., Ozaki K., Ogasawara N. // Microb. Cell Fact. 2012. V. 11. https://doi.org/74-10.1186/1475-2859-11-74

Acidification of Culture Medium by Products of Glucose Metabolism Inhibit Synthesis of Heterologous Extracellular α-Amylase by *Bacillus subtilis 168*

A. V. Kachan^{*a*}, * and A. N. Evtushenkov^{*a*}

^aBelarusian State University, Minsk, 220030 Belarus *e-mail: av.kachan@mail.ru

The synthesis of α -amylase AmyM3 from *B. flexus* 406 in recombinant strain *B. subtilis* 168-28 was significantly repressed during submerged cultivation in nutrient medium supplemented with 1% glucose. Repression of α -amylase synthesis by glucose in *B. subtilis* cells observed at the level of transcription and mediated by catabolite control protein CcpA. After deletion of putative *cre* site in the *amyM3* gene the effect of catabolite repression was eliminated, but the amount of extracellular α -amylase still significantly decreased in the presence of glucose. It was shown that a shift of the cultivation medium pH to 5.8–6.0, caused by glucose overflow metabolites excreted by *B. subtilis*, despite the high level of *amyM3* gene activity, interferes with the synthesis of active extracellular α -amylase, probably affecting post-secretory folding of the enzyme. This observation is a newly demonstrated facet of CcpA-mediated influence of preferentially utilized sugars on extracellular α -amylase production in *Bacillus subtilis*.

Keywords: Bacillus subtilis, alpha-amylase, catabolite repression, gene expression regulation, exoenzyme synthesis