



УДК 577.151.01

Термофильная и алкалофильная бактерии из экстремальных водных экосистем Бурятии – продуценты внеклеточных протеаз

Е. В. Лаврентьева¹, А. П. Шагжина¹, А. А. Раднагуруева¹,
Б. Б. Намсараев¹, Я. Е. Дунаевский²

¹Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ,

²НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

E-mail: lena_l@mail.ru

Аннотация. Была изучена динамика накопления протеолитической активности в процессе роста культур П1 и Ц3 в зависимости от источника азота. Культуры выделены из донных осадков гидротермы пос. Горячинск и содово-соленого озера Соленое. Штаммы активно продуцируют протеазу, гидролизующую специфичный для субтилизиноподобных протеиназ синтетический субстрат ГААЛП, наибольшая активность наблюдается на 24-й час роста культур. Протеазы стабильны при температуре 40–50 °С и pH 6,0–11,3. Ингибиторный анализ показал, что при добавлении до 1 мМ ФМСФ наблюдается полное ингибирование протеолитической активности. Данные ингибиторного анализа и субстратной специфичности наиболее активных внеклеточных протеаз штаммов П1 и Ц3 указывают на их принадлежность к классу сериновых протеаз субтилизиноподобного типа.

Ключевые слова: протеазы, протеолитическая активность, субстратная специфичность, ингибиторный анализ.

Щелочные гидротермы и содово-соленые озера Бурятии являются экстремальными экосистемами, представляющими значительный интерес как для фундаментальных исследований, так и при решении ряда практических задач. Термофильные, алкалофильные и алкало-толерантные бактерии водных экосистем привлекательны повышенной устойчивостью промышленных штаммов к контаминации посторонней микрофлорой, что крайне важно в производстве стандартизованного ферментного препарата. Среди секретируемых внеклеточных ферментов важная роль принадлежит протеазам, принимающим активное участие в использовании микроорганизмами органических субстратов [7].

Выделенные протеазы находят применение в различных областях биотехнологии – от индустриального производства гидролитических ферментов для детергентов до использования в генетических и молекулярно-биологических исследованиях [6; 8].

Исследования, касающиеся внеклеточной протеолитической активности гетеротрофных термофильных и алкалофильных бактерий из экстремальных водных систем Бурятии, практически полностью отсутствуют. Целью работы являлось изучение термофильной и алкало-

фильной бактерий из экстремальных водных экосистем Бурятии – продуцентов внеклеточных протеаз

Материалы и методы

Источник выделения и условия культивирования. Из донных осадков гидротермы Горячинск и содово-соленого озера Соленое были выделены 2 аэробные гетеротрофные бактерии. Выделенные штаммы обозначены как П1 и Ц3, соответственно. Культивирование штамма П1 проводили на мясо-пептонном бульоне при 55 °С в статических условиях. Штамм Ц3 инкубировали на среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; Na_2CO_3 – 10; глюкоза – 10; пептон – 5; дрожжевой экстракт (ДЭ) – 5. pH среды устанавливали равной 9,5, концентрацию NaCl – 40 г/дм³. Пробы культивировали стационарно в течение 3 суток при температуре 30 °С.

Определение протеолитической активности. После инкубации клетки осаждали центрифугированием (13000 g, 15 мин); полученный супернатант использовали для определения активности протеаз. Общую активность измеряли по гидролизу 1 % раствора желатины при pH равное 8,0, с помощью метода тринитрофенилирования [5]. Специфическую актив-

ность секретируемых протеаз определяли на 5 мМ п-нитроанилидных субстратах: N-бензоил-L-аргинил-п-нитроанилид (БАПА), пироглутамил-аланил-аланил-лейцил-п-нитроанилид (ГААЛП). Протеолитическую активность по отношению к синтетическим субстратам определяли спектрофотометрически при 410 нм по количеству образовавшегося п-нитроанилида [4].

Определение оптимума рН-активности и рН-стабильности фермента. Для определения оптимума и стабильности рН секретируемой протеиназы по отношению к синтетическим субстратам были использованы 0,02 М растворы цитратно-фосфатного, трис-НСl и глицин-NaOH буферов в диапазоне рН от 2,9 до 11,6. Определение активности проводили как описано выше.

Определение температурного оптимума и температурной стабильности. Температурный оптимум и стабильность фермента определяли, измеряя активность фермента при значениях температуры от 30 до 90 °С. Активность определяли стандартным методом при 37 °С.

Ингибиторный анализ. Для выяснения природы функциональных групп активного центра использовали ингибиторы сериновых протеаз – фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ), трипсиноподобных протеаз – хлорметилкетон тозил-L-лизина (ТЛХК), химотрипсиноподобных протеаз – хлорметилкетон тозилфенилаланина (ТФХК), цистеиновых протеаз – йодацетамид (ЙАА), металлопротеаз – этилендиаминтетраацетат (ЭДТА).

Результаты и обсуждение.

Из донных осадков гидротермы Горячинск и содово-соленого озера Соленое были выделены 2 аэробные гетеротрофные бактерии. Минеральный источник Горячинск характеризуется высокими значениями температуры (50,1 °С) и рН (9,0). В содово-соленом озере Соленое отмечены высокие значения рН (9,9) и общая минерализация (5,6 г/дм³).

Выделенные штаммы показали активный и стабильный рост при различных значениях температуры и рН:

– Штамм П1:

t_{\min} при 45 °С, $t_{\text{opt}} = 60$ °С и $t_{\max} = 70$ °С;

– Штамм Ц3:

pH_{\min} при 7,0, $\text{pH}_{\text{opt}} = 9,0$ и $\text{pH}_{\max} = 11,0$.

Изучение физиологических параметров показало, что штамм П1 отнесен к группе умеренных термофилов. По отношению к рН штамм Ц3 является алкалофилом.

На основании данных неполного секвенирования генов 16S рРНК штамм П1 имеет сходство 99,3 % с представителями рода *Bacillus* *Anoxybacillus pushchinoensis* и *A. bogroviensis*. Результаты анализа последовательности 16S рРНК штамма Ц3 показали 100 % гомологию с известным алкало- и галофильным видом р. *Bacillus*: *B. krulwichiae*.

Внеклеточная протеолитическая активность. Штаммы П1 и Ц3 были исследованы на способность секретировать внеклеточные протеазы, активные на различных синтетических субстратах: БАПА, ГААЛП, ФПА, общая активность протеаз определена на желатине и азоказеине. Была изучена динамика накопления протеолитической активности в процессе роста этих культур и в зависимости от источника азота.

Изучение спектра протеаз, секретируемых различными штаммами, выявило, что как штамм П1, так и Ц3, активно продуцируют протеазу, гидролизующую специфичный для субтилизинподобных протеиназ синтетический субстрат ГААЛП. Остальные активности, присутствующие в среде, имели заметно более низкие уровни.

Анализ изменения активности внеклеточных протеаз в процессе роста выявил характерные особенности штаммов П1 и Ц3 в динамике роста культур и накоплении ферментов.

Следует отметить, что наибольшая активность внеклеточных протеаз наблюдается через 24 ч роста культур. При этом момент повышения внеклеточной протеолитической активности совпадает с замедлением роста культур. Сходные результаты по динамике накопления протеаз были получены при изучении *Bacillus pumilus* КММ 62 [2].

Определение оптимумов рН и Т-активности и рН и Т-стабильности фермента. Было изучено влияние температуры и рН на активность и стабильность наиболее представленной внеклеточной протеазы, гидролизующей ГААЛП.

Протеиназы штамма П1 проявляют максимум активности при 55–70 °С. Протеиназы штамма Ц3 наиболее активны при 30–40 °С. Температурный оптимум фермента штамма П1 составил 60 °С, фермент сохранял более 70 % активности при температуре до 70 °С.

Исходя из полученных данных можно заключить, что культуры стабильны до 40–50 °С, при этом повышение до 70 °С (в течение 20 мин) приводит к практически полной потере ферментативной активности.

Ранее другими авторами отмечалось, что высокая термостабильность присуща практически всем представителям семейства субтилизиноподобных протеаз, в том числе бациллярным субтилизином, например, субтилизину 72 и термитазе [1].

Исследование влияния рН на субтилизиноподобные протеиназы, секретируемые штаммами П1 и Ц3, показало, что протеиназы стабильны при рН 6,0–11,3. Протеиназа штамма П1 проявляла максимальную активность при рН 10,5 и была стабильна в интервале от 6,1 до 11,0. Штамм Ц3 активен при рН 8,17–8,8 и стабилен от 7,5 до 11,3. По данным литературы известно, что многие бактериальные субтилизиноподобные протеиназы сохраняют активность при высоких значениях рН. К ним относятся субтилизин Sendai из *Bacillus* sp G-825-6, который сохраняет стабильность при рН 12,0, ArgP из *Bacillus pumilus* TУO-67 (рН 9,0) и другие. Такая стабильность, как правило, обусловлена более ригидной и гидрофобной поверхностной областью белковой глобулы субтилизинов [3].

Результаты сравнительного анализа функциональных групп активного центра показали, что активность исследуемых ферментов полностью ингибировалась ФМСФ – специфическим ингибитором сериновых протеаз. Данные ингибиторного анализа показали, что при добавлении ФМСФ до 1 мМ наблюдается полное ингибирование внеклеточной протеолитической активности по отношению и к белковому субстрату.

Дальнейшие исследования влияния ингибиторов активного центра выявили, что ТФХК и ТЛХК – ингибиторы химотрипсин- и трипсин-подобных ферментов оказались неэффективны по отношению к этой активности. Ингибиторы других классов протеаз – металлопротеаз, цистеиновых протеаз – не действовали на изученные ферменты или действовали очень слабо. Исходя из результатов ингибиторного анализа и субстратной специфичности, можно предположить, что секретируемые ферменты штаммов П1 и Ц3 относятся к классу сериновых протеаз субтилизин-подобного типа.

Таким образом, в настоящем исследовании нами были выделены и охарактеризованы два штамма аэробных гетеротрофных бактерий. Филогенетически штамм П1 наиболее близок видам *Anoxybacillus pushchinoensis* и *Anoxyba-*

cillus bogroviensis, а штамм Ц3 виду *B. krulwichia*. Показано, что внеклеточная протеолитическая активность у штаммов П1 и Ц3 обладает высокой субстратной специфичностью. Активная секреция внеклеточных ферментов совпадает с замедлением роста культур во время пост-экспоненциальной фазы. Данные ингибиторного анализа и субстратной специфичности наиболее активных внеклеточных протеаз штаммов П1 и Ц3 указывают на их принадлежность к классу сериновых протеаз субтилизин-подобного типа. Штаммы П1 и Ц3 показали высокую активность и стабильность сериновых протеаз при высоких значениях температуры и рН.

Литература

1. Котлова Е. К. Сериновая тиолзависимая протеиназа *Paecilomyces lilacinus*: выделение и свойства / Е. К. Котлова [и др.] // Биохимия. – 2007. – Т. 72, вып. 1. – С. 137–144.
2. Маликова Л. А. Условия биосинтеза внеклеточной субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* КММ 62 / Л. А. Маликова [и др.] // Микробиология. – 2007. – Т. 76, вып. 3. – С. 313–320.
3. Михайлова Е. О. Выделение и характеристика субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* AJ 73, на разных фазах роста бацилл / Е. О. Михайлова [и др.] // Биохимия. – 2007. – Т. 72, вып. 2. – С. 228–235.
4. Erlanger B. F. Proteinases activity in biological substrats / B. F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen // Arch. Biochem. Biophys. – 1961. – Vol. 95. – P. 271–278.
5. Habeeb T. S. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid / T. S. Habeeb // Analyth. Biochem. – 1966. – Vol. 14. – P. 328–336.
6. Sunna A. Identification of *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermocatennulatus* and *Bacillus* strain HSR as members of *Bacillus thermoleovorans* / A. Sunna [et al.] // System. Appl. Microbiol. – 1997. – Vol. 20. – P. 232–237.
7. Ward O. P. Proteolytic enzymes / O. P. Ward // In. M. Moo-Young Editor. Comprehensive Biotechnol, 1985. – Vol. 3. – P. 789–818.
8. Zeikus J. Thermozyms: Biotechnology and structure-function relationship / J. Zeikus, C. Vielle, A. Savchenko // Extremophiles. – 1998. – Vol. 1. – P. 179–183.

Thermophilic and alkaliphilic bacteria isolated from extreme aqua ecosystems of Buryatia – producers of extracellular protease

Lavrentieva E. V.¹, Shagzhina A. P.¹, Radnagurueva A. A.¹, Namsaraev B. B.¹, Dunaevskiy Y. E.²

¹Institute of General and Experimental Biology SB of RAS, Ulan-Ude,

²Belozersky Research Institute for Physical-Chemical Biology, MSU, Moscow

Abstract. Dynamics of accumulation of proteolytic activity during growth of cultures П1 and Ц3 depending on a source of nitrogen has been studied. Cultures are allocated from ground deposits of hydrotherms Goryachinsk and soda-saline lake Solenoe. Strains actively produce protease, which hydrolyze a specific for subtilisinlike proteinases synthetic substratum GAALP, the greatest activity is observed on 24 h growth of cultures. Protease are stable at temperature 40–50 °C and pH 6,0–11,3. Inhibit analysis has shown, that at addition up to 1 mM FMSF the full inhibition of proteolytic activity is observed. Data of the inhibit analysis and substrate specificity of the most active extracellular protease of the strains П1 и Ц3 indicate to their accessory to a class of serine protease of the subtilisinlike type.

Key words: protease, proteolytic activity, substrate specificity, inhibit analysis.

Лаврентьева Елена Владимировна
Институт общей и экспериментальной биологии
СО РАН
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
кандидат биологических наук
тел. (301 2) 43–49–02
E-mail: lena_l@mail.ru

Lavrentieva Elena Vladimirovna
Institute of General and Experimental Biology of SB
RAS
670047, Ulan-Ude, 6, Sakhyanovoi St.
Ph. D. in Biology
phone: (301 2) 43–49–02
E-mail: lena_l@mail.ru

Шагжина Айви Петровна
Институт общей и экспериментальной биологии
СО РАН
кандидат биологических наук
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
тел. (301 2) 43–49–02
E-mail: ivee@mail.ru

Shagzhina Aiva Petrovna
Institute of General and Experimental Biology of SB
RAS
670047, Ulan-Ude, 6, Sakhyanovoi St.
Ph. D. in Biology
phone: (301 2) 43–49–02
E-mail: ivee@mail.ru

Раднагуруева Арюна Александровна
Институт общей и экспериментальной биологии
СО РАН
аспирант
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
тел. (301 2) 43–49–02

Radnagurueva Aryuna Aleksandrovna
Institute of General and Experimental Biology of SB
RAS
670047, Ulan-Ude, 6, Sakhyanovoi St.
doctoral student
phone: (301 2) 43–49–02

Намсараев Баир Бадмабазарович
Институт общей и экспериментальной биологии
СО РАН
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
доктор биологических наук, профессор
зав. лабораторией микробиологии
тел. (301 2) 43–49–02
E-mail: bair_n@mail.ru

Namsaraev Bair Badmabazarovitch
Institute of General and Experimental Biology SB RAS
670047, Ulan-Ude, 6, Sakhyanovoi St.
D. Sc. in Biology, Prof., Head of Laboratory
of Microbiology
phone: (301-2) 43-42-11, fax: (301-2) 43-30-34
E-mail: bair_n@mail.ru

Дунаевский Яков Ефимович
Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
Научно исследовательский институт физико-
химической биологии им. А. Н. Белозерского
119991, г. Москва, Ленинские горы, строение А 40
доктор биологических наук, профессор, ст. науч.
сопр. отдела иммуномодуляторов
тел. (495) 938–55–51
E-mail: dun@belozersky.msu.ru

Dunaevskiy Yakov Efimovitch
Moskov State University
Belozersky Research Institute for Physical-Chemical
Biology, 125212, Moscow, b. A40, Vorobyevy Gory
D. Sc. in Biology, Prof, leading research scientist,
Department of Immunomodulators
phone: (495) 938–55–51
E-mail: dun@belozersky.msu.ru