

Научная статья
УДК 577.151(571.54)
DOI: 10.18101/2542-0623-2023-3-68-74

**БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУР,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СОДОВОГО ОЗЕРА НУХЭ-НУР
(БАРГУЗИНСКАЯ КОТЛОВИНА, РЕСПУБЛИКА БУРЯТИЯ)**

А. А. Раднагуруева, Е. В. Лаврентьева

© Раднагуруева Арюна Арсалановна

кандидат биологических наук,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
aryuna_rg@mail.ru

© Лаврентьева Елена Владимировна

кандидат биологических наук,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова
Россия, 670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а
lena_l@mail.ru

Аннотация. Из донных осадков содового озера Нухэ-Нур выделены две алкалола-
лофильные культуры бактерии. На основании анализа последовательности гена 16S
рРНК культуры отнесены к родам *Alkalimonas* и *Paenibacillus*. Изучена внеклеточная
пептидазная активность штаммов. Показано, что секретируемые пептидазы культуры
NN22n обладают широкой субстратной специфичностью, тогда как пептидаза куль-
туры NN22s — узкой субстратной специфичностью и гидролизует белки и пара-нитро-
анилидные субстраты, проявляя максимальную активность по гидролизу L-лейцил-
п-нитроанилида (LpNa). Культура NN22n продуцирует как эндопептидазы, так и экзо-
пептидазы, тогда как культура NN22s — только экзопептидазы, что свидетельствует об
особенности конкретного вида бактерии и его способности гидролизовать один и тот
же белковый субстрат различными ферментативными механизмами.

Ключевые слова: содовые озера, Нухэ-Нур, Баргузинская котловина, пептидазная
активность, пара-нитроанилидные субстраты.

Благодарности

Работа выполнена в рамках НИР «Микробные сообщества экстремальных природных
экосистем Байкальского региона: структурно-функциональная организация и биотех-
нологический потенциал», Рег. № 121030100229-1

Для цитирования

Раднагуруева А. А., Лаврентьева Е. В. Биохимическая характеристика культур,
выделенных из содового озера Нухэ-Нур (Баргузинская котловина, Республика Бурятия)
// Природа Внутренней Азии. Nature of Inner Asia. 2023. № 3(25). С. 68–74.
DOI: 10.18101/2542-0623-2023-3-68-74

Введение

Баргузинская котловина расположена между Баргузинским и Икатским хребтами у северо-восточного побережья Байкала в Республике Бурятия. В Баргузинской котловине расположены различные группы озер, различающиеся по происхождению и морфологии, гидрохимическому и гидрологическому режимам [Таксономическое разнообразие... 2021]. Содовые озера представляют собой экстремальные экосистемы, в которых алкалофильное микробное сообщество является основной живой компонентой в этих озерах.

Озеро Нухэ-Нур ($53^{\circ}38'781''$ с. ш. $109^{\circ}56'807''$ в. д., высота 479 м над ур. м.) площадью около 2–2,5 км² располагается в надпойменном понижении на степном участке долины по правому берегу реки Баргузин.

Изучение пептидаз бактерий, выделенных из экстремальных мест обитания, предоставляет уникальную возможность исследовать стратегии функционирования прокариотной клетки. Предполагается, что усиленный синтез гидролитических ферментов является одним из способов адаптации бактерий к экстремальным условиям местообитания [Ward, 1985]. В настоящее время микроорганизмы представляют собой наиболее перспективный источник получения пептидаз за счет их высокого биохимического разнообразия и относительно высокой стабильности и активности [Lei et al., 2017; Аминопептидазная активность... 2018]. Протеолитические ферменты микробного происхождения широко используются в промышленности и являются многоцелевыми ферментами.

Целью нашей работы являлось выделение алкалогалофильных бактерий из содового озера Нухэ-Нур и изучение их биохимической характеристики, а именно внеклеточной протеолитической активности.

Материал и методика

Пробы донных осадков для микробиологического анализа были отобраны в июле 2022 г. До проведения анализов пробы, отобранные в стерильную тару, хранили в холодильнике при -20°C .

В местах отбора проб температуру измеряли сенсорным электротермометром Long E905050 (Prima, Португалия), pH определяли потенциометрически, при помощи портативного pH-метра (pHep2, Португалия). Минерализацию воды определяли при помощи портативного тестер-кондуктометра TDS-4 (HM Digital, Сингапур) [Органотрофные бактерии... 2016].

Культуры NN22s и NN22n выделены из донных осадков содового озера Нухэ-Нур, расположенного в Курумканском районе Республики Бурятия. Штаммы бактерий были выделены на среде состава (г/л): NH_4Cl — 0,4; KH_2PO_4 — 0,5; NaNO_3 — 0,4; MgCl_2 — 0,2; Na_2SO_4 — 0,5; NaCl — 0,5; дрожжевой экстракт — 1. В качестве источника азота использовали триптон в конечной концентрации 1,5 %. Оптимальные значения pH роста бактерий устанавливали карбонат-бикарбонатным буфером до pH 9,0–9,5 [Раднагуруева и др., 2011]. Культуры инкубировались при 30°C .

Для определения биохимических характеристик культур использовали культуральную жидкость (КЖ) штаммов NN22s и NN22n. КЖ штаммов отбирали каждые 24 часа в течение 6 суток. После инкубации клетки осаждали центрифугированием (12 000 об/мин, 15 мин), полученный супернатант использовали для определения активности пептидаз.

Определение внеклеточной протеолитической активности в культуральной жидкости проводили по методу Эрлангера [Erlanger et al., 1961], используя 5 мМп-нитроанилидные субстраты пептидаз-трипсиноподобных, субтилизиноподобных, химотрипсинподобных, цистеиновых аминопептидаз (ВАРА, GlpAALpNA, GlpFpNA, GlpFApNA и FpNA, LpNA соответственно) [Раднагуруева и др., 2011]. Измерение активности пептидаз проводили по ранее описанной методике [Аминопептидазная активность... 2018].

Результаты и обсуждение

Из накопительных культур донных осадков озера Нухэ-Нур (рН 9,6; М=9,8 г/дм³) (северное и южное соответственно) были выделены аэробные культуры NN22n и NN22s с устойчивым ростом на агаризованной среде Пфеннига с триптоном (рН 9). На плотной среде штамм NN22n образует круглые глянцевые, блестящие колонии кремового цвета, пигментирующие в среду, штамм NN22s образует крупные белые колонии диаметром 10–15 мм, матовые с неровными краями.

По результатам анализа гена 16S рРНК чистых культур бактерий было получено около 500 последовательностей гена, кодирующего 16S рРНК, что недостаточно для точной идентификации штаммов. По предварительному анализу последовательности гена 16S рРНК по результатам BLAST-анализа мы можем предположить, что наиболее близкими к исследованному штамму NN22 n могут быть виды: *Alkalimonas callagenimarina*, *Alkalimonas delamerensis*, *Alkalimonas amylolytica*. Уровень сходства с гомологами составил 99,32 %. Ближайшими гомологами штамма NN22s были виды *Paenibacillus mobilis*, *Paenibacillus amylolyticus*, *Paenibacillus pabuli*. Уровень сходства со всеми — 99,31 %. Для более точной идентификации штаммов будет определена полная последовательность гена, кодирующего 16S рРНК.

На основании определения оптимальных параметров и границ роста по отношению к NaCl штаммы отнесены к умеренным галлофилам. Культуры NN22s и NN22n способны расти в широком диапазоне концентраций NaCl от 10 до 50 г/л с оптимумом 20–30 г/л (табл. 1). Температурный диапазон роста культур достаточно широкий и составил 20–40 °С с оптимумом при 30 °С.

Таблица 1

№	Штамм	Ближайшие гомологи (% сходства)	NaCl _{опт} , г/дм ³	T _{опт} , °С
1	NN22n	<i>Alkalimonas callagenimarina</i> (99,32 %) <i>Alkalimonas delamerensis</i> (99,32 %) <i>Alkalimonas amylolytica</i> (99,32 %)	30	30
2	NN22s	<i>Paenibacillus mobilis</i> (99,66 %) <i>Paenibacillus amylolyticus</i> (99,31 %) <i>Paenibacillus pabuli</i> (99,31 %)	20–50	30

Наиболее важными характеризующими свойствами фермента, синтезируемыми бактериями, является его строение субстратсвязывающего участка молекулы и строение каталитического участка. Этими свойствами обуславливается

способность расщеплять субстраты известного состава. Поэтому нами были проведены исследования по определению субстратной специфичности.

Нами проведено сравнительное изучение секреции внеклеточных пептидаз в зависимости от минерализации и времени культивирования (до 6 суток культивирования). Показано, что культура NN22n активно продуцирует ферменты в широком диапазоне концентрации NaCl 0–50 г/л с максимальной секрецией на 5-е сутки культивирования (рис. 1). По остальным субстратам — похожая картина.

Изученная культура NN22n показала высокие активности в отношении всех субстратов (рис. 2). Максимум активности по субстрату BAPA, GlpAALpNa отмечен на 5-е сутки культивирования и составила 0,85 и 0,49 ед. соответственно. По субстрату для химоотрипсинподобных пептидаз GlpFpNA максимум секреции показан на 6-е сутки культивирования — 0,66 ед.

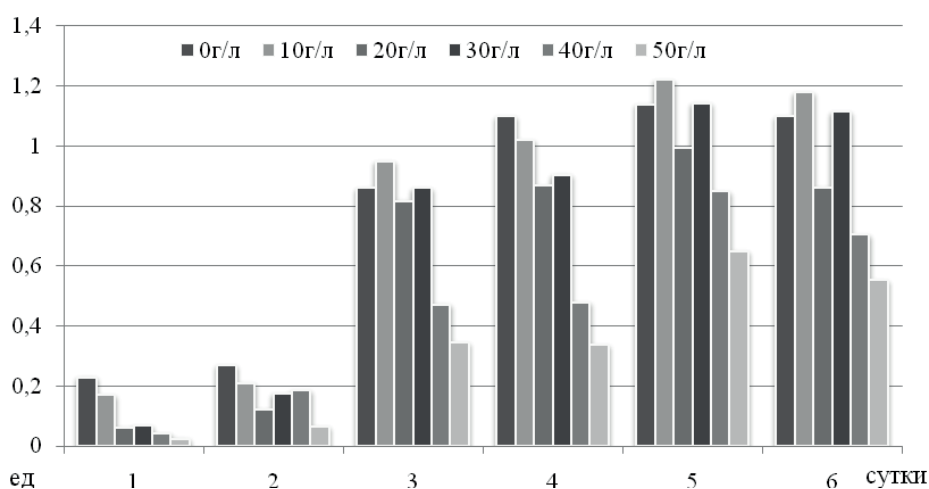


Рис. 1. Внеклеточная пептидазная активность культуры NN22n по субстрату BAPA в зависимости от концентрации NaCl и времени культивирования

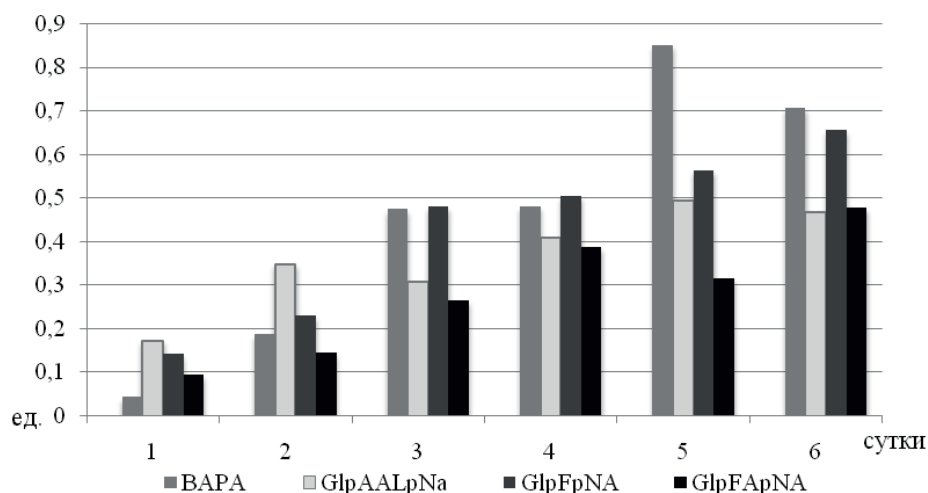


Рис. 2. Внеклеточная пептидазная активность культуры NN22n по различным субстратам

Штамм NN22s не гидролизует субстраты для эндопептидаз, но гидролизует субстраты для экзопептидаз. Показано, что культуры NN22n и NN22s гидролизуют субстрат для аминокпептидаз — LeupNa (рис. 3). Максимум активности по этому субстрату определены на 3–4-е сутки культивирования. Полученные данные свидетельствуют о том, что пептидазы штаммов расщепляют связи, образованные гидрофобной аминокислотой — лейцин.

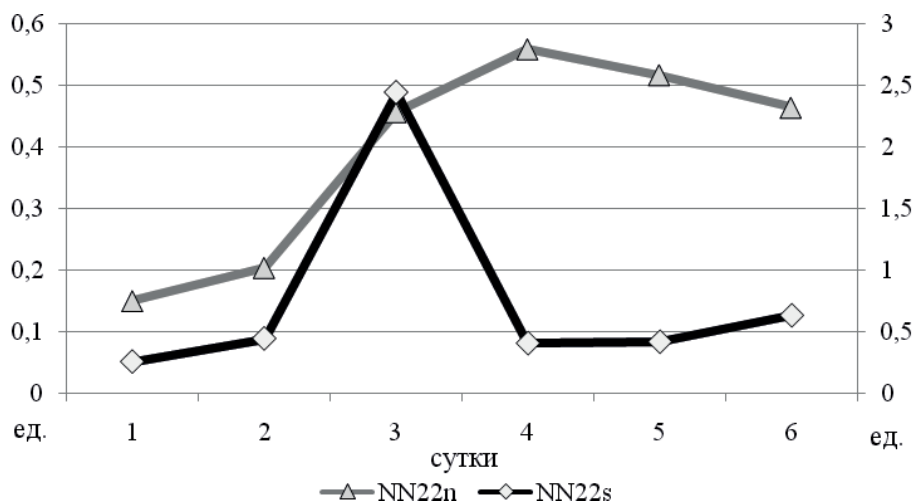


Рис. 3. Субстратная специфичность на п-нитроанилидном субстрате LeupNA у штаммов NN22n и NN22s в зависимости от времени культивирования

Таким образом, результаты показали границы адаптации и функционирования выделенных бактерий в экстремальных условиях содового озера Нухэ-Нур. Анализ внеклеточной пептидазной активности культур NN22n и NN22s на различных п-нитроанилидных субстратах показал различную субстратную специфичность. Культура NN22n продуцирует как эндопептидазы, так и экзопептидазы, тогда как культура NN22s — только экзопептидазы, что свидетельствует об особенности конкретного вида бактерии и его способности гидролизовать один и тот же белковый субстрат различными ферментативными механизмами. Способность ферментов к расщеплению белков в условиях повышенной минерализации и в щелочных условиях играет важную роль для их жизнедеятельности в экстремальных местах обитания.

Литература

1. Аминопептидазная активность галоалкалофильных бактерий рода *Halomonas*, выделенных из содово-соленых озер пустыни Бадаин Жаран / Е. Б. Эрдынеева, А. А. Раднагуруева, Я. Е. Дунаевский [и др.] // Микробиология. 2018. Т. 87, № 4. С. 397–408. Текст : непосредственный.
2. Органотрофные бактерии горячих источников Байкальской рифтовой зоны / А. А. Раднагуруева, Е. В. Лаврентьева, Т. Г. Будагаева [и др.]. // Микробиология. 2016. Т. 85, № 3. С. 347–360. Текст : непосредственный.

3. Биохимическая характеристика культуры Um-09m / А. А. Раднагуруева, Е. В. Лаврентьева, Б. Б. Намсараев, Я. Е. Дунаевский // Вестник Бурятского государственного университета. Биология. География. 2011. № 3. С. 94–97. Текст : непосредственный.

4. Таксономическое разнообразие микробных сообществ в содовом озере Нухэ-Нур (Баргузинская котловина, Бурятия) / Е. В. Лаврентьева, Т. Г. Банзаракцаева, В. Б. Дамбаев. [и др.] // Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии. 2021. С. 264–266. Текст : непосредственный.

1. Erlanger B. F., Kokowsky N., Cohen W. The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrates of Trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 1961; 95: 271–278.

2. Lei F., Zhao Q., Sun-Waterhouse D., Zhao M. Characterization of a Salt-Tolerant Aminopeptidase from Marine *Bacillus Licheniformis* SWJS33 that Improves Hydrolysis and Debitting Efficiency for Soy Protein Isolate. *Food Chem.* 2017; 214: 347–353.

3. Ward O. P. Proteolytic enzymes. In. M. Moo-Young (Ed.) *Comprehensive Biotechnology*. 1985, vol. 3, pp. 789–818.

Статья поступила в редакцию 04.09.2023; одобрена после рецензирования 11.09.2023; принята к публикации 13.09.2023.

BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF CULTURE ISOLATED FROM SODA LAKE NUKHE-NUR (BARGUZIN DEPRESSION, THE REPUBLIC OF BURYATIA)

A. A. Radnagurueva, E. V. Lavrentyeva

Aryuna A. Radnaguruyeva

Cand. Sci. (Biol.),

Institute for General and Experimental Biology SB RAS

6 Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670043, Russia

aryuna_rg@mail.ru

Elena V. Lavrentyeva

Cand. Sci. (Biol.),

Institute for General and Experimental Biology SB RAS

6 Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670043, Russia

Dorzhi Banzarov Buryat State University

24a Smolina St., Ulan-Ude 670000, Russia

lena_l@mail.ru

Abstract. As a part of the study, we have isolated two alkalihalophilic bacterial cultures from the bottom sediments of the Nukhe-Nur soda lake. Based on the analysis of the 16S rRNA gene sequence, the cultures have been assigned to *Alkalimonas* and *Paenibacillus* genera. The article analyzes the extracellular peptidase activity of the strains. It is shown that secretable peptidases of the NN22n culture have narrow substrate specificity, while the peptidase of the NN22s culture has narrow substrate specificity and hydrolyzes proteins and para-nitroanilide substrates, exhibiting maximum activity in hydrolysis of L-leucyl-n-nitroanilide (LpNa), the NN22n culture produces both endopeptidases and exopeptidases, while the NN22s culture produces only exopeptidases, which indicates the specificity of a particular bacterial species and its ability to hydrolyze the same protein substrate by different enzymatic mechanisms.

Keywords: soda lakes, Nukhe-Nur, Barguzin Depression, peptidase activity, para-nitroanilide substrates.

Acknowledgements

The work was carried out within the framework of the research project “Microbial Communities of Extreme Natural Ecosystems of the Baikal Region: Structural and Functional Organization and Biotechnological Potential”, Reg. No. 121030100229-1

For citation

Radnagurueva A. A., Lavrentyeva E. V. Biochemical Characteristics of Culture Isolated from Soda Lake Nukhe-Nur (Barguzin Depression, the Republic of Buryatia). *Nature of Inner Asia*. 2023; 3(25): 68–74 (In Russ.).

DOI: 10.18101/2542-0623-2023-3-68-74

The article was submitted 04.09.2023; approved after reviewing 11.09.2023; accepted for publication 13.09.2023.