

УДК 577.151.01

© А. А. Раднагуруева, Е. В. Лаврентьева, Е. Б. Эрдынеева

**БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРЫ
PAENIBACILLUS DENDRITIFORMIS ШТАММ Ga-35**

*Работа выполнена при финансовой поддержке грантов
РФФИ №№ 15-04-01275, 16-34-00254 и МОН РФ №1993*

*Изучена биохимическая характеристика культуры *Paenibacillus dendritiformis* штамм Ga-35. Показано, что культура обладает высокой субтилизиноподобной активностью. Пептидаза стабильна в широком диапазоне температур от 23 до 60°C и pH от 7,6 до 10,4. Субстратная специфичность и совокупность результатов ингибиторного анализа свидетельствуют о присутствии в исследованной культуре внеклеточных субтилизин-подобных пептидаз.*

Ключевые слова: гидротермы, Гарга, алкалитермофильная культура, внеклеточная пептидаза, *Paenibacillus dendritiformis*, субтилизин, Байкальская рифтовая зона

A. A. Radnagurueva, E. V. Lavrentieva, E. V. Erdineeva

**BIOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF *PAENIBACILLUS
DENDRITIFORMIS* STRAIN Ga-35 CULTURE**

*Biochemical characteristic of strain Ga-35 *Paenibacillus dendritiformis* is studied. It is shown that culture has a high subtilisin-like activity. Peptidase are stable in a wide range of temperatures from 23 up to 60°C and pH from up 7,6 to 10,4. The data on substrate specificity and the results of inhibition analysis demonstrated the presence of extracellular subtilisin-like peptidases in the studied culture.*

Keywords: hydrotherms, Garga, alkalithermophilic culture, extracellular peptidase, *Paenibacillus dendritiformis*, subtilisin, Baikal rift zone

В последние годы микроорганизмы, обитающие в экстремальных условиях, находятся в центре внимания исследователей. Щелочные гидротермы Байкальского региона являются экстремальными экосистемами, представляющими значительный интерес, как для фундаментальных исследований, так и при решении ряда практических задач. Термофильные алкалофильные и алкалитолерантные бактерии этих гидротерм подобно другим экстремофилам, являясь продуцентами промышленно значимых ферментов, привлекательны повышенной устойчивостью промышленных штаммов к контаминации посторонней микрофлорой, что крайне важно в производстве стандартизованного ферментного препарата [1].

Известно, что большинство ферментов, используемых до настоящего времени в коммерческих целях, получены из мезофильных микроорганизмов. Несмотря на многие преимущества, применение этих ферментов ограничено из-за низкой стабильности при экстремальных значениях температуры и pH. Термофилы водных экстремальных экосистем могут обеспечить уникальные

источники термостабильных ферментов, многие из которых могут показать существенную разницу от известных наземных филотипов.

Целью представленной работы было изучение внеклеточной протеолитической активности алкалитермофильной бактерии Ga-35 *Paenibacillus dendritiformis*, выделенной из горячего источника Гарга.

Объекты и методы исследования

Культура Ga-35 выделена из цианобактериального мата горячего источника Гарга, расположенного в Курумканском районе республики Бурятия. Штамм бактерий культивировали на среде состава (г/л): NH_4Cl - 0,3; KH_2PO_4 - 0,3; MgCl_2 - 0,3; CaCl_2 - 0,3; дрожжевой экстракт - 0,5. В качестве источника азота использовали пептон в конечной концентрации 1,5%. Оптимальные значения $\text{pH}^{25^\circ\text{C}}$ роста бактерий устанавливали карбонат-бикарбонатным буфером до pH 8,5-9,0. Культура инкубировалась при 55°C на комплексной среде в течение трех суток. После инкубации клетки осаждали центрифугированием (12000 об/мин, 15 мин), полученный супернатант использовали для определения активности пептидаз.

Определение внеклеточной протеолитической активности в культуральной жидкости проводили по методу Эрлангера [2], используя 5 мМ пара-нитроанилидные субстраты пептидаз - трипсиноподобных, субтилизиноподобных и цистеиновых (BAPA, GlpAALpNA и GlpFApNA соответственно) и на белковом субстрате азоказеине, используемом для определения общей активности. Для выяснения природы функциональных групп активного центра штамма к раствору фермента добавляли раствор соответствующего ингибитора, инкубировали 1 ч при температуре 37°C , затем добавляли раствор субстрата и определяли активность.

В работе использовались ингибиторы металлопептидаз - этилендиаминтетраацетат Na (ЭДТА), цистеиновых пептидаз - иодацетамид (ИАА) и сериновых пептидаз - фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ). Для определения оптимума $\text{pH}^{25^\circ\text{C}}$ активности исследуемых пептидаз по отношению к синтетическим субстратам был использован универсальный буфер [3] в диапазоне pH 3,24-12. Температурный оптимум и стабильность ферментов определяли, измеряя их активность после часовой инкубации при температурах от 23 - 80°C .

В качестве источника секретируемых внеклеточных пептидаз использовали культуральную жидкость алкалитермофильной бактерии Ga-35 *Paenibacillus dendritiformis*.

Результаты и обсуждение

Наиболее важным фактором, определяющим активность внеклеточных ферментов, является наличие в питательной среде оптимального субстрата в процессе роста культуры. Нами проведено сравнительное изучение секреции внеклеточных пептидаз в зависимости от источника азота (триптон, пептон,

казеин, неорганический источник азота) и времени культивирования (от 12 до 96 ч) на внеклеточную протеолитическую активность.

Установлено, что максимальная активность по азоказеину у культуры Ga-35 проявляется на среде с триптоном на 48-60 ч культивирования.

Изучение протеолитической активности на специфичном для субтилизин-подобных пептидаз субстрате – GlpAALpNa показало наличие у штамма Ga-35 наиболее высокой внеклеточной протеолитической активности, которая составила 3,7 ед/мг белка (48 ч). Показано, что кроме активности по субстрату GlpAALpNa, культура Ga-35 гидролизует субстраты аминопептидаз – R-pNa, L-pNa и Y-pNa (0,68, 0,54 и 0,87 ед/мг белка, соответственно). Максимум активности по этим субстратам определены на 24 ч культивирования. Полученные данные свидетельствуют о том, что пептидазы штамма активно расщепляют связи, образованные гидрофобными аминокислотами (аланин, валин, лейцин). Таким образом, изученный штамм обладает различной субстратной специфичностью. Наблюдаемая различная специфичность возможно отражает метаболические особенности конкретного вида бактерии, свидетельствуя о том, что процесс гидролиза одного и того же белкового субстрата может быть выполнен с использованием разных ферментативных механизмов.

Результаты исследований указывают на то, что существенный вклад в пептидазную активность культуры Ga-35 вносят пептидазы с субтилизин-подобной специфичностью, гидролизующие субстраты, содержащие в цепи несколько остатков аланина (GlpAALpNa) [4]. Большое количество бактериальных пептидаз, внеклеточная протеолитическая активность которых представлена, в основном, субтилизин-подобными пептидазами, согласуется с литературными данными – субтилизины находили в культуральной жидкости многих видов бактерий [5, 6].

Так как исследуемая культуры бактерия способна расти в экстремальных условиях, представляло интерес выяснить, насколько адаптированы к экстремальным условиям секретируемые ими ферменты. С этой целью было изучено влияние температуры и pH на активность и стабильность наиболее представленной внеклеточной пептидазы, гидролизующей GlpAALpNa.

Определение температурного оптимума и стабильности ферментов проведены в диапазоне 23-80°C. Внеклеточные пептидазы штамма Ga-35 имели оптимум активности при 50°C, стабильность сохранялась до 60°C. Повышение температуры до 80°C в течение 1 ч, приводило к практически полной потере ферментативной активности.

Анализ литературы показывает, что субтилизин-подобные пептидазы характеризуются широким интервалом температурного оптимума и стабильности. По мнению ряда авторов, высокая стабильность пептидаз бацилл обеспечивается гидрофобными и ионными взаимодействиями, а также водородными связями и дисульфидными мостиками в белковой глобуле субтилаз [5, 7, 8]

Пептидаза штамма Ga-35 *Paenibacillus dendritiformis* сохраняла стабильность в диапазоне pH от 7,6 до 10,4 с оптимумом активности при pH 9,8.

Из литературных данных известно, что многие бактериальные субтилизин-подобные пептидазы сохраняют активность при высоких значениях pH. К ним относятся субтилизин Sendai из *Bacillus* sp G-825-6, который сохраняет стабильность при pH 12.0, AprP из *Bacillus pumilus* TУО-67 (pH 9,0) и другие. Было установлено, что высокое число гидрофобных и заряженных аминокислот на поверхностной области белковой глобулы субтилизинов обеспечивает ее стабильность при высоких значениях pH [7]. Можно предположить, что высокая щелочеустойчивость изученных белков служит адаптационным механизмом бактерий, которая позволяет им функционировать в экстремальных условиях.

Полученные нами данные указывают на то, что секретируемые пептидазы бактериального штамма Ga-35 *Paenibacillus dendritiformis* имеет оптимум pH в щелочной области и pH стабильность, вполне покрывающую диапазон pH, свойственный местам их обитания.

Определение природы функциональных групп активного центра показал, что активность внеклеточных пептидаз по субстрату GlpAALpNA у изученного штамма Ga-35 *Paenibacillus dendritiformis* подавляется специфическим ингибитором сериновых пептидаз – фенилметилсульфонилфторидом (FMSF). Ингибиторы цистеиновых пептидаз – йодацетамид (IAA) и металлопептидаз – этилендиаминтетраацетат (EDTA) не оказывали влияния на активность.

На основании определения природы функциональных групп активного центра и субстратной специфичности, можно предположить, что в препаратах культуральной жидкости культуры Ga-35 *Paenibacillus dendritiformis* преимущественно содержатся пептидазы, относящиеся к классу сериновых пептидаз субтилизин-подобного типа.

Согласно полученным результатам, показано, что изученная алкалитермофильная культура активно секретировала сериновые пептидазы, в частности субтилизин-подобные. Известно, что сериновые пептидазы обнаружены у всех групп живых организмов (от архей до высших эукариот), живущих на Земле. Также известно, что секреция субтилизин-подобных пептидаз является признаком характерным для бактерий наиболее древних в эволюционном аспекте. Возможно, что сериновые пептидазы термофильных и алкалофильных микробных сообществ могли играть важную роль в функционировании древнейших наземных экосистем.

Литература

1. Кевбрин В. В. Термофильные алкалофильные микроорганизмы. Труды ин-та микробиологии им. С. Н. Виноградского. - М.: Наука, 2007. - Вып. XIV. – С. 374-395.
2. Erlanger B. F., Kokowsky N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // Arch. Biochem. Biophys. – 1961. – V.

95. – P. 271-278.

3. Досон Р., Эллиот Д., Элиот У., Джонс К. Справочник биохимика. – М.: Мир, 1991. - 544 с.

4. Ballinger M. D. Subtilisin. In: Handbook of proteolytic enzymes / Eds. Barrett A. J., Rawlings N. D., Woessner J. F. - London: Academic Press, 1998. - Electronic version on PC CD-ROM.

5. Балабан Н. П., Шарипова М. Р., Габдрахманова Л. А. и др. Синтез и секреция протеиназ *Bacillus intermedius* на поздних стадиях спорообразования // Микробиология. - 2003. - Т. 72. - С. 338-342.

6. Маликова Л. А., Марданова А. М., Соколова О. В. и др. Условия биосинтеза внеклеточной субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* КММ62 // Микробиология. - 2007. - Т. 76, Вып. 3. - С. 1-8.

7. Михайлова Е. О., Марданова А. М., Балабан Н. П., Руденская Г. Н., Шарипова М. Р. Выделение и характеристика субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* AJ 73 на разных фазах роста бацилл // Биохимия. - 2007. - Т. 72, Вып. 2. - С. 228-235.

8. Vieille C., Zeikus G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability // Microbiol. Mol. Biol. Rev. - 2001. - V. 65. - P. 1-43.

Раднагуруева Арюна Арсалановна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, 670047, Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6, e-mail: aryuna_rg@mail.ru

Лаврентьева Елена Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, старший преподаватель кафедры зоологии и экологии, Бурятский государственный университет, 670047, Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6, e-mail: lena_l@mail.ru

Эрдынеева Елена Базыровна, аспирант, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, 670047, Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

Radnagurueva Aryuna Arsalanovna, candidate of biological sciences, research assistant, Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Sakhyanovoy, 6, St., Ulan-Ude, 670047

Lavrentieva Elena Vladimirovna, candidate of biological sciences, senior researcher, Institute of General and Experimental Biology SB RAS, senior lecturer, Department of zoology and ecology, Sakhyanovoy, 6, St., Ulan-Ude, 670047

Erdineeva Elena Bazurovna, post-graduate, Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Sakhyanovoy, 6, St., Ulan-Ude, 670047