

УДК 577.152.3:579.68

**АКТИВНОСТЬ О-ГЛИКОЗИДГИДРОЛАЗ И ДРУГИХ
ПОЛИСАХАРИД-ДЕГРАДИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ
У КУЛЬТИВИРУЕМЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ КРАСНОЙ
ВОДОРΟΣЛИ *Ahnfeltia tobuchiensis*
(KANNO ET MATSUBARA, 1932) MAKIENKO, 1970**

© 2020 г. И. Ю. Бакунина^{1, *}, О. И. Недашковская¹, Л. А. Балабанова¹,
А. Д. Кухлевский², О. С. Белоус²

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
Владивосток 690022, Россия

²Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
Владивосток 690041, Россия

*e-mail: bakun@list.ru

Поступила в редакцию 21.11.2019 г.

После доработки 26.01.2020 г.

Принята к публикации 30.01.2020 г.

Впервые дана характеристика профилям активности О-гликозидгидролаз и альгинат-лиаз бактерий, ассоциированных с красной водорослью *Ahnfeltia tobuchiensis*, которые играют важную роль в трофических взаимоотношениях организмов хозяина и бактерий.

Ключевые слова: *Ahnfeltia tobuchiensis*, морские бактерии, О-гликозидгидролазы, альгинат-лиазы, полиманнуронат-лиазы, гликозидазы

DOI: 10.31857/S0134347520050022

В дальневосточных морях России неприкрепленная к субстрату красная водоросль *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara, 1932) Makienko, 1970 (рис. 1) формирует обширные пласты толщиной от 0.1 до 1 м на илистом или илисто-песчаном грунте, которые могут занимать несколько десятков квадратных километров поверхности дна. Этот вид является важным компонентом морских экосистем из-за его вклада в очистку прибрежных вод, подверженных антропогенному загрязнению. К тому же *A. tobuchiensis* имеет значительную экономическую ценность как промышленный источник агара. Данный полисахарид нашел широкое применение в микробиологии и различных отраслях пищевой промышленности.

Хорошо известно, что бактерии колонизируют поверхность макроводорослей и в большинстве случаев эпифитные бактериальные сообщества весьма видоспецифичны (Goeske et al., 2010). Многие штаммы бактерий, выделенные из разных водорослей, способны разлагать продуцируемые водорослями-хозяевами полисахариды — альгинаты, целлюлозу и др. Считается, что бактерии участвуют в процессе распада водорослей благодаря ферментным системам, разлагающим полисахариды клеточной стенки до моно- и оли-

госахаридов. Сравнительное изучение таксономического положения штаммов с высокой степенью гидролитической активности необходимо для проведения направленного скрининга ферментов, представляющих интерес для медицины и биотехнологии.

Цели настоящей работы — изучение разнообразия активности О-гликозидгидролаз и других углеводов-деградирующих ферментов в бактериях, выделенных из микробного сообщества красной водоросли *A. tobuchiensis*, а также анализ распространения активности этих ферментов среди бактериальных продуцентов с разным таксономическим статусом.

Штаммы бактерий выделяли методом прямого высева из таллома красной водоросли *A. tobuchiensis* (рис. 1б), собранного со стороны Охотского моря вблизи о-ва Итуруп (Курильские острова) во время экспедиции на НИС “Академик Опарин”. Бактерии, изолированные в данном эксперименте, идентифицировали на основе стандартных фенотипических, хемотаксономических и генотипических характеристик, как описано ранее (Nedashkovskaya et al., 2007). Принадлежность к роду и виду определяли по последовательности нук-



Рис. 1. Внешний вид *Ahnfeltia tobuchiensis*. а – переплетенные талломы, б – разветвленная структура.

леотидов в гене 16S рРНК, а также по комбинации физиологических и биохимических характеристик штаммов (Бакунина и др., 2012).

Бактерии культивировали, получали бактериальные гомогенаты и экстракты, а также определяли концентрации белка и активность ферментов по стандартным методикам (Bakunina et al., 2013). В качестве субстратов для гликозидаз использовали хромогенные гликозиды (“Sigma-Aldrich”, США). За единицу стандартной активности (U) гликозидазы принимали такое количество фермента в 1 мл экстракта, под действием которого образуется 1 мкмоль *n*-НФ за 1 мин в условиях эксперимента. Удельную активность рассчитывали как отношение стандартных единиц на 1 мг белка.

Активность полисахарид-гидролаз (ЕС 3.2.1.-) и альгинат-лиаз (4.2.2.-) определяли по нарастанию восстанавливающих сахаров, как описано ранее (Bakunina et al., 2013). Количество восстанавливающих сахаров рассчитывали по оптической плотности растворов при 750 нм с помощью метода Шомоги–Нельсона. Калибровочные кривые строили для модельных растворов D-глюкозы (“Merck”, США) или L-фукозы (для фукоиданазы). За одну единицу стандартной активности фермента принимали такое его количество в 1 мл

экстракта, под действием которого высвобождается 1 мкмоль восстанавливающих сахаров за 1 мин.

В качестве субстратов для α - и β -галактозидазы, α - и β -глюкозидазы, α -N-ацетилгалактозаминидазы, α -фукозидазы, α -маннозидазы, α -ксилозидазы и β -N-ацетилглюкозаминидазы использовали *n*-нитрофенил- α - и β -D-галактопиранозиды, *n*-нитрофенил- α - и β -D-глюкопиранозиды, *n*-нитрофенил- α -N-ацетилгалактозаминид, *n*-нитрофенил- α -L-фукопиранозид, *n*-нитрофенил- α -D-маннопиранозид, *n*-нитрофенил- α -D-ксилопиранозид и *n*-нитрофенил- β -N-D-ацетилглюкозаминид соответственно.

Для детектирования активности ферментов, разлагающих полисахариды, в качестве субстратов использовали декстран, водорастворимый агар, амилозу, карбоксиметилцеллюлозу и полигулурановую кислоту, полученные от “Sigma-Aldrich” (США). Фукоидан из *Fucus evanescens* (α -1,3; 1,4-L-фукансульфат) (Урванцева и др., 2004), пустулан из лишайника *Umbilicaria rossica* (β -1,6-D-глюкан) (Звягинцева и др., 1986), ламинаран из *Laminaria cichorioides* (β -1,3; 1,6-D-глюкан) (Zvyagintseva et al., 2003), а также полиманнурановую кислоту из *Alaria fistulosa* (см.: Zvyagintseva et al., 2005) выделяли и очищали в лаборатории.

С поверхности красной водоросли *A. tobuchiensis* были выделены 284 чистые культуры бактерий. Детально были изучены профили О-гликозидгидролаз и полисахарид-лиаз 92 штаммов гетеротрофных бактерий. Сравнительный филогенетический анализ последовательностей 16S рРНК показал, что полученные бактерии-продуценты характеризовались богатым видовым разнообразием и относились к 69 филотипам четырех филумов, среди которых доминировали *Bacteroidetes* (45 штаммов – 48.9%) и *Proteobacteria* (39 штаммов – 42.4%); представителей *Actinobacteria* (7 штаммов – 7.6%) и *Firmicutes* (1 штамм – 1.1%) было значительно меньше. Следует отметить, что при полифазном анализе таксономической структуры

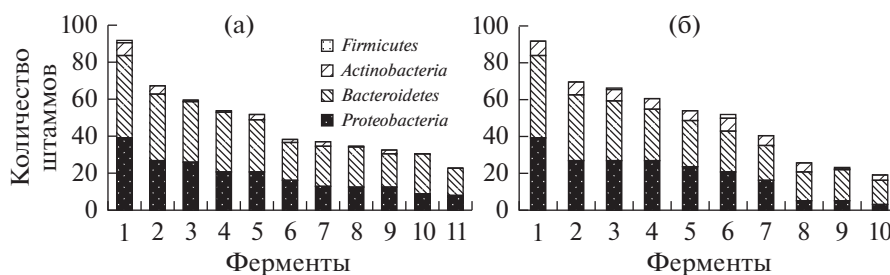


Рис. 2. Распределение активности полисахарид-гидролаз и полисахарид-лиаз среди представителей четырех филумов микробного сообщества (а), а также профили гликозидазной активности бактерий (б). (а): 2 – α -амилаза, 3 – полиманнуронат-лиаза, 4 – ламинариназа, 5 – полигулуранат-лиаза, 6 – фукоиданаза, 7 – декстраназа, 8 – каррагинаназа, 9 – пустуланаза, 10 – целлюлаза, 11 – агарараза; (б): 2 – β -N-ацетилглюкозаминидаза, 3 – α -глюкозидаза, 4 – β -галактозидаза, 5 – β -глюкозидаза, 6 – α -галактозидаза, 7 – α -ксилозидаза, 8 – α -маннозидаза, 9 – α -фукозидаза, 10 – α -N-ацетилгалактозаминидаза; 1 – общее количество изученных штаммов.

данного сообщества было установлено точное таксономическое положение двух новых для науки штаммов флавобактерий, которые обладали гликозидгидролазной активностью. Им были присвоены валидные названия *Flavobacterium ahnfeltiae* sp. nov. и *Polaribacter staleyi* sp. nov. (см.: Nedashkovskaya et al., 2014, 2018).

В результате скрининга были отобраны штаммы, показавшие наиболее высокую активность полисахарид-гидролаз и гликозидаз (22 и 16 соответственно). Продуценты полисахарид-гидролаз включали представителей 14 родов, среди которых наиболее часто встречались *Polaribacter*, *Winogradskyella* и *Zobellia* филума *Bacteroidetes*. Высокая активность гликозидаз отмечена у 16 штаммов, принадлежащих к 9 родам; преобладали представители *Amylibacter* филума *Proteobacteria*, *Salinibacterium* филума *Actinobacteria* и *Zobellia* филума *Bacteroidetes*.

Анализ распределения активности полисахарид-гидролаз и полисахарид-лиаз среди представителей четырех филумов микробного сообщества показал, что все сырые экстракты штаммов проявляли активность α -амилазы и α -глюкозидазы (рис. 2а, 2б: колонка 2 соответственно), которые участвуют в деградации крахмала — резервного полисахарида *A. tobuchiensis*. Активность полиманнуронат-лиаз, ламинариназ и полигулуронат-лиаз (рис. 2а: колонки 3, 4 и 5 соответственно), типичная для обитателей морской среды, также отмечена во всех экстрактах бактерий. Наиболее распространенными среди изолятов микробного сообщества *A. tobuchiensis* оказались β -N-ацетилглюкозаминидазы (рис. 2б: колонка 2). Эти гликозидазы часто детектировались у обитателей морской среды (Иванова и др., 1998; Бакунина и др., 2012; Балабанова и др., 2018). Они участвуют во многих важных физиологических процессах и входят в состав хитинлитического комплекса микроорганизмов. Редко встречались продуценты α -N-ацетилгалактозаминидазы (рис. 2б: колонка 9), а также фукоидазы и каррагиназы, субстраты для которых (фукоидан и каррагинан) *A. tobuchiensis* не синтезируются.

Таким образом, впервые получены сведения о полисахарид-деградирующей активности культивируемых бактерий микробного сообщества красной водоросли *A. tobuchiensis*, которые характеризуются высоким метаболическим потенциалом, позволяющим бактериям определять жизненную стратегию и играть важную роль во взаимоотношениях с организмом-хозяином.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит материалов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бакунина И.Ю., Недашковская О.И., Ким С.Б. и др. Разнообразие гликозидазных активностей бактерий филума *Bacteroidetes*, изолированных из морских водорослей // Микробиология. 2012. Т. 81. № 6. С. 688—695.
- Балабанова Л.А., Бакунина И.Ю., Слепченко Л.В. и др. Полисахарид-деградирующая активность морских и наземных штаммов мицелиальных грибов // Биоорг. химия. 2018. Т. 44. № 4. С. 431—437.
- Звягинцева Т.Н. А.с. № 1227199 СССР МКИ⁴ А 61 К 35/78. Способ получения пустилана / Звягинцева Т.Н., Елякова Л.А., Сундукова Е.В., Кривошекова О.Е., Мищенко Н.П. // заявл. 16.12.83.; опубл. 30.04.86. № 3741257/28-14. Бюл. № 16. 2 с.
- Иванова Е.П., Бакунина И.Ю., Недашковская О.И. и др. Распространение морских микроорганизмов, продуцирующих β -N-ацетилглюкозаминидазы, α -галактозидазы, α -N-ацетилгалактозаминидазы // Биол. моря. 1998. Т. 24. № 6. С. 365—372.
- Урванцева А.М., Бакунина И.Ю., Ким Н.Ю. и др. Выделение очищенного фукоидана из природного комплекса с полифенолами и его характеристика // Химия раст. сырья. 2004. № 3. С. 15—24.
- Bakunina I.Y., Nedashkovskaya O.I., Balabanova L.A. et al. Comparative analysis of glycoside hydrolases activities from phylogenetically diverse marine bacteria of the genus *Arenibacter* // Mar. Drugs. 2013. V. 11. № 6. P. 1977—1998.
- Goecke F., Labes A., Wiese J., Imhoff J.F. Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2010. V. 409. P. 267—299.
- Nedashkovskaya O.I., Kim S.B., Shin D.S. et al. *Echinicola vietnamensis* sp. nov., a member of the phylum *Bacteroidetes* isolated from seawater // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. 761—763. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.64546-0>
- Nedashkovskaya O.I., Balabanova L.A., Zhukova N.V. et al. *Flavobacterium ahnfeltiae* sp. nov., a new marine polysaccharide degrading bacterium isolated from Pacific red alga // Arch. Microbiol. 2014. V. 196. № 10. P. 745—752.
- Nedashkovskaya O.I., Kim S.-G., Balabanova L.A. et al. *Polaribacter staleyi* sp. nov., a polysaccharide-degrading marine bacterium isolated from the red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. № 2. P. 623—629. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002554>
- Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O. et al. Water-soluble polysaccharides of some far Eastern brown algae. Distribution, structure and their dependence on developmental conditions // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2003. V. 294. № 1. P. 1—13.
- Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Nazarenko E.L. et al. Water-soluble polysaccharides of some brown algae of the Russian Far East. Structure and biological action of low-molecular mass polyuronans // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2005. V. 320. № 2. P. 123—131.

Activities of O-Glycoside Hydrolases and Other Polysaccharide-Degrading Enzymes of Cultivable Bacterial Isolates of the Pacific Red Alga *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara, 1932) Makienko, 1970

I. Y. Bakunina^a, O. I. Nedashkovskaya^a, L. A. Balabanova^a, A. D. Kukhlevsky^b, and O. S. Belous^b

^a*G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia*

^b*A. V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia*

The profiles of bacterial O-glycoside hydrolases and alginate lyases associated with the red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* are described for the first time. A role of these enzymes in the trophic relationships of the host-organism and bacteria is discussed.

Keywords: *Ahnfeltia tobuchiensis*, marine bacteria, O-glycoside hydrolases, alginate lyases, polymannuronate lyases, glycosidases