

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

ПЕПТИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *PROTEINIVORAX*
И ИХ ВОЗМОЖНАЯ ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ В МИКРОБНОМ
СООБЩЕСТВЕ СОДОВЫХ ОЗЕР ТАНАТАР (АЛТАЙСКИЙ КРАЙ)

© 2019 г. Е. В. Лаврентьева^{a, b, *}, Е. Б. Эрдынеева^a, Я. Е. Дунаевский^c,
Ю. В. Болтянская^d, В. В. Кевбрин^d

^aИнститут общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, 670047 Россия

^bБурятский государственный университет им. Д. Банзарова, Улан-Удэ, 670000 Россия

^cМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^dИнститут микробиологии имени С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: lena_l@mail.ru

Поступила в редакцию 24.05.2019 г.

После доработки 19.07.2019 г.

Принята к публикации 29.07.2019 г.

Изучена пептидазная активность у алкалофильных анаэробных протеолитических бактерий рода *Proteinivorax*, *P. tanatarense* Z-910^T и *P. hydrogeniformans* Z-710^T, выделенные из системы гиперсоленых щелочных озер Танатар (Алтайский край). Показано, что штаммы Z-910 и Z-710 способны гидролизовать *para*-нитроанилидные субстраты, проявляя максимальную активность по гидролизу GIpAALpNA и LpNA. Установлено, что пептидазы наиболее активны в щелочных условиях при pH 8–10 и термостабильны до 50°C. Данные ингибиторного анализа и субстратной специфичности изученных внеклеточных ферментов указывают на их принадлежность к классам сериновых пептидаз субтилизин-подобного типа (штамм Z-910) и металлопептидаз аминокпептидазного типа (штамм Z-710).

Ключевые слова: содовые озера, протеолитические бактерии рода *Proteinivorax*, субстратная специфичность, сериновая пептидаза и металлопептидаза

DOI: 10.1134/S0026365619060077

Алкалофильное микробное сообщество представляет собой совокупность взаимодействующих между собой микроорганизмов с кооперативными трофическими связями и обладающих специализированным набором ферментов для трансформации энергии и вещества. Первичная продукция органического вещества в содовых озерах осуществляется, главным образом, за счет активного развития фототрофных микроорганизмов. В состав органического вещества фототрофных микроорганизмов, как и любых других, входят белки, являющиеся потенциальным субстратом для протеолитических бактерий. Последние выделяют внеклеточные пептидазы, осуществляющие гидролиз высокомолекулярных белковых веществ, и в процессе роста поставляют летучие жирные кислоты и аммиак в трофические цепи микробных сообществ (Ryzhmanova et al., 2017). Гидролиз белков, несмотря на однотипность и кажущуюся простоту реакций, является одним из сложных процессов в функционировании биологических систем и осуществляется при участии большого числа разнообразных протеолитиче-

ских ферментов и множества факторов, регулирующих их активность.

Пептидазы (ЕС 3.4) представляют собой отдельную подгруппу гидролитических ферментов, которые катализируют расщепление пептидных связей в белковых субстратах. В зависимости от способа действия и каталитического механизма пептидазы делятся на шесть основных классов: сериновые (ЕС 3.4.21), цистеиновые (ЕС 3.4.22), аспарагиновые пептидазы (ЕС 3.4.23), металлопептидазы (ЕС 3.4.24), треониновые (ЕС 3.4.25) и глутаминовые эндопептидазы (ЕС 3.4.23.32) (<http://merops.sanger.ac.uk>). Помимо их ключевой метаболической и физиологической значимости, они имеют широкое коммерческое применение во всем мире (Thakur et al., 2018).

К настоящему времени известно несколько истинно алкалофильных ($pH_{min} > 7$) анаэробных протеолитических бактерий, относящихся к родам *Alkaliphilus*, *Anaerovirgula*, *Anoxynatronum*, *Natronaerobius*, *Natronincola*, *Spirochaeta*, *Anaerobranca*, *Tindallia* и *Proteinivorax*, выделенных из при-

родных щелочных биоценозов (Kevbrin et al., 2013), однако проблема микробного разложения белков протеолитическими бактериями в системе гиперсоленых озер в настоящее время изучена недостаточно.

Представители последнего рода (порядок *Clostridiales*, филум *Firmicutes*) были выделены нами ранее и, на сегодняшний день, включают два вида: *P. tanatarense* (Kevbrin et al., 2013) и *P. hydrogeniformans* (Boltyanskaya et al., 2018). Оба вида были выделены из микробных сообществ щелочных озер Танатар (Алтайский край) и характеризуются ограниченным перечнем возможных субстратов. Максимальный рост этих бактерий был получен только на белковых веществах: триптоне, пептоне, дрожжевом экстракте. Однако по трофическим предпочтениям существенным межвидовым различием оказалась способность организмов к гидролизу белка: *P. tanatarense* мог расти на неразрушенных белках (альбумин, казеин, желатин), тогда как *P. hydrogeniformans* – нет.

Целью настоящего исследования было изучить пептидазную активность у галоалкалофильных протеолитических бактерий *P. tanatarense* Z-910^T и *P. hydrogeniformans* Z-710^T и определить возможную функциональную роль этих бактерий в трофической системе микробного сообщества.

Для изучения субстратной специфичности внеклеточных пептидаз штаммов Z-910 и Z-710 использовали различные *n*-нитроанилидные субстраты: BAPA, GlpFpNA, GlpAALpNA, GlpFApNA, L-pNa и F-pNa, специфичные, соответственно, для трипсин-, химотрипсин-, субтилизин-подобных, цистеиновых и аминокислотных пептидаз. Активность пептидаз определяли методом Эрлангера (Erlanger et al., 1961): в ячейку микропланшета вносили 160 мкл карбонатного буфера (pH 9.2), добавляли 10 мкл культуральной жидкости, 10 мкл соответствующего субстрата (20 мМ) и измеряли оптическое поглощение раствора в нулевой момент. Затем смесь инкубировали при 37°C, определяя изменение поглощения раствора через определенные промежутки времени. Количество образовавшегося продукта, *n*-нитроанилина, определяли спектрофотометрически при 405 нм на микропланшетном фотометре StatFax 2100 (“Awareness Technology Inc.”, США) в 96-луночных планшетах, используя дифференциальный фильтр 492 нм. При определении активности по отношению к GlpFApNA к реакционной смеси дополнительно добавляли 5 мкл свежеприготовленного раствора дитиотрейтола (10 мг/мл).

Оптимальный pH пептидаз на *n*-нитроанилидных субстратах определяли с использованием 0.1 М универсального буфера (диапазон pH 3–11.2) по методике, описанной выше. Для определения pH стабильности ферментов реакционную смесь инкубировали 4 ч при 37°C в буфере в диапазоне pH

от 3 до 11.2. Затем образцы доводили до pH 9 с помощью 0.1 М универсального буфера, либо 0.5 М раствором NaOH и определяли активность при 37°C, как указано выше.

Температурный оптимум пептидаз определяли, измеряя их активность при температурах от 30 до 60°C. Для изучения температурной стабильности раствор фермента инкубировали при тех же температурах в течение 4 ч, затем определяли активность при 37°C, как указано выше.

Природу функциональных групп активного центра пептидаз исследовали ингибиторным анализом, который проводили как с использованием частично очищенных ферментных препаратов, так и культуральной жидкости. В работе использовали специфические ингибиторы: для сериновых пептидаз – PMSF (фенилметилсульфонил-фторид, 10⁻³ М); металлопептидаз – EDTA (этилендиаминтетраацетат натрия, 10⁻¹ М); цистеиновых пептидаз – IAA (йодацетамид, 10⁻² М).

Была исследована способность штаммов Z-910 и Z-710 секретировать внеклеточные пептидазы, гидролизующие *n*-нитроанилидные субстраты, специфичные для пяти групп пептидаз: трипсин-, химотрипсин-, субтилизин-подобных, цистеиновых и аминокислотных пептидаз (BAPA, GlpFpNA, GlpAALpNA, GlpFApNA и LpNa соответственно), а также белковый субстрат – азоказеин/казеин, используемый для определения общей протеолитической активности.

Ранее в работе Nguyen et al. (2019) было показано, что геном бактерий, в отличие от архей, обладает большим потенциалом для синтеза широкого спектра пептидаз. Нами обнаружено, что штаммы Z-910 и Z-710 способны гидролизовать синтетические субстраты BAPA, GlpAALpNA и LpNa. При этом активность пептидаз в отношении этих субстратов зависела от типа белка, вносимого в среду культивирования. Так, у штамма Z-910 максимальная активность в отношении субстрата GlpAALpNA проявлялась при культивировании штамма на интактной биомассе цианобактерии *Geitlerinema* sp. Z-T0701, одном из типичных первичных продуцентов содовых озер Танатар, и составила 1.6 ед., тогда как при росте на триптоне и казеине активность по GlpAALpNA не превышала 0.3 ед. Активность пептидаз штамма Z-910 в отношении L-pNa составила 0.36 ед. при культивировании на среде с *Geitlerinema* sp. и 0.2 ед. на средах с триптоном или казеином. Активность в отношении субстрата трипсин-подобных пептидаз – BAPA, составила 0.9 ед. при росте на триптоне и на биомассе цианобактерии, а на казеине – 0.7 ед. Пептидазы штамма Z-710, выращенного на средах с казеином, пептоном и триптоном, были активны в отношении субстрата для аминокислотных пептидаз; наибольшая активность – 0.2 ед.,

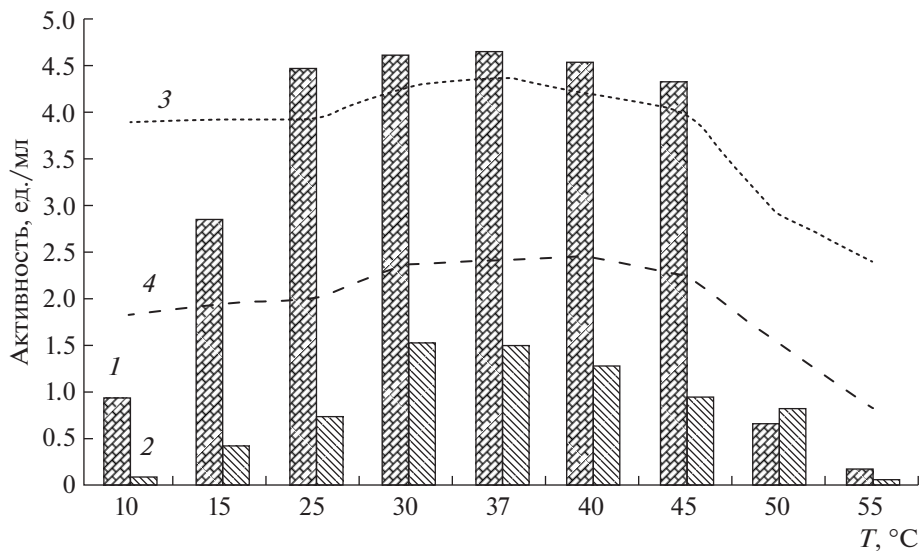


Рис. 1. Температурный оптимум и термостабильность внеклеточных пептидаз *P. tanatarense* Z-910 и *P. hydrogeniformans* Z-710. Обозначения: 1 – оптимум по GIpAALpNA для Z-910, 2 – оптимум по LpNa для Z-710, 3 – стабильность по GIpAALpNA для Z-910, 4 – стабильность по LpNa для Z-710.

обнаружена при росте на среде с добавлением триптона.

Наличие у изученных бактерий пептидаз с широким спектром субстратной специфичности свидетельствует о том, что в природных условиях обитания эти бактерии: 1) могут проявлять большую гибкость в реализации типа протеолитической активности, 2) являются конкурентоспособными в получении органического азота в условиях содовых озер.

Помимо выявления типов пептидаз, была также изучена их протеолитическая активность в зависимости от условий культивирования продуцентов – штаммов Z-910 и Z-710 (температуры, pH и солености), регуляторно влияющих на синтез пептидаз. При определении активности секреторируемых пептидаз в диапазоне температур от 25 до 45°C наибольшая активность на всех субстратах была обнаружена при 35°C. Определение активности внеклеточных пептидаз в зависимости от pH показало, что у обоих штаммов Z-910 и Z-710 ферменты обладали наибольшей активностью при pH 9.0–10.0. По устойчивости к солености (0.5–3 М NaCl) пептидаза штамма Z-910, специфичная к субстрату GIpAALpNA, показала высокую активность в присутствии 1 М NaCl. В отношении синтетических субстратов LpNa и ВАРА максимальная ферментативная активность обнаружена при минерализации NaCl 1.5 и 2 М соответственно. Штамм Z-710 проявил наибольшую продуктивность при солености 1, 1.5 и 2 М в отношении пептидаз, активных к GIpAALpNA, ВАРА и LpNa соответственно.

Таким образом, проведенные исследования показали, что активность секреции пептидаз штаммами Z-910 и Z-710 регулируется рядом факторов, таких как состав среды (спектр белковых субстратов) и ее физико-химические параметры (pH, температура и соленость), что определяет способность бактерий адаптироваться к изменениям условий обитания в природных системах.

Влияние температуры и pH на протеолитическую активность и стабильность ферментов была изучена на примере наиболее характерных внеклеточных пептидаз, гидролизующих субстраты GIpAALpNA (штамм Z-910) и L-pNa (штамм Z-710). Показано, что пептидазы активны в диапазоне температур от 15 до 50°C с максимумом при 37°C (штамм Z-910) и 30°C (штамм Z-710). Оптимумы pH пептидаз, секреторируемых штаммами Z-910 и Z-710, отмечены при pH 9.8 и 9.3 соответственно, диапазон pH стабильности находился в пределах от 4.8 до 10.5 (рис. 1, 2).

Таким образом, секреторируемые пептидазы изученных бактериальных штаммов имели оптимум pH в щелочной области и диапазон pH стабильности, вполне покрывающий диапазон pH, свойственный местам их обитания.

У наиболее характерных пептидаз исследуемых штаммов была определена природа функциональных групп активного центра. Было показано, что активность пептидаз штамма Z-910 подавлялась специфическим ингибитором сериновых пептидаз – PMSF, а на активность пептидаз штамма Z-710 ингибиторное влияние оказывал EDTA. Исходя из результатов ингибиторного анализа и субстратной специфичности, можно сделать

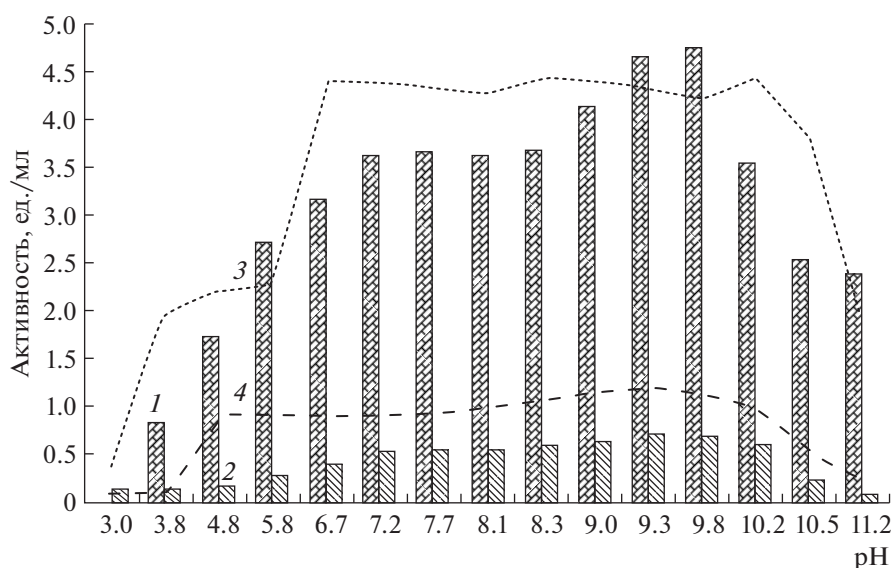


Рис. 2. pH-Оптимум и pH стабильность внеклеточных пептидаз *P. tanatarense* Z-910 и *P. hydrogeniformans* Z-710. Обозначения: 1 – оптимум по GIpAALpNA для Z-910, 2 – оптимум по LpNa для Z-710, 3 – стабильность по GIpAALpNA для Z-910, 4 – стабильность по LpNa для Z-710.

вывод, что секретируемые ферменты относятся к классам сериновых пептидаз субтилизин-подобного типа (штамм Z-910) и металлопептидаз аминокпептидазного типа (штамм Z-710).

Таким образом, алкалофильные анаэробные протеолитические бактерии *P. tanatarense* Z-910 и *P. hydrogeniformans* Z-710 являются синтетиками пептидаз, способных гидролизовать *n*-нитроанилидные субстраты, с проявлением максимальной активности по гидролизу GIpAALpNA и LpNa. Возможно, что высокая внеклеточная пептидазная активность, обнаруженная у изученных нами штаммов, ассоциирована с типом их клеточной стенки – *P. tanatarense* Z-910 и *P. hydrogeniformans* Z-710 относятся к грамположительным бактериям. Ранее было отмечено, что грамположительные бактерии выделяют больше внеклеточных ферментов в окружающую среду, по сравнению с грамотрицательными (Chróst, 1991; Brown et al., 2015).

Характерно, что пептидазный комплекс штамма Z-910 проявлял максимальную активность при культивировании на интактной биомассе цианобактерии, что на энзимологическом уровне подтверждает продемонстрированную ранее в лабораторных экспериментах способность организма утилизировать “природную” белковую компоненту (Болтынская, Кевбрин, 2016). Цианобактерии рода *Geitlerinema* sp. являются одними из организмов-эдификаторов в микробных сообществах озер Танатар.

Ранее нами была постулирована возможная экологическая роль *P. tanatarense* в сообществе как анаэробного сапротрофа (Болтынская, Кев-

брин, 2016). Другой вид этого рода, *P. hydrogeniformans*, оказался классическим диссипотрофом, использующим для роста только низкомолекулярные соединения (Boltynskaya et al., 2018). Проведенные исследования показали, что функциональная роль алкалофильных анаэробных протеолитических бактерий *P. tanatarense* Z-910 и *P. hydrogeniformans* Z-710 определяется субстратной специфичностью гидролитических ферментов и высокой энзиматической активностью в отношении используемых субстратов определенной трофической группы.

Таким образом, изучена пептидазная активность у алкалофильных анаэробных протеолитических бактерий *Proteinivorax*, *P. tanatarense* Z-910^T и *P. hydrogeniformans* Z-710^T, выделенных из системы гиперсоленых щелочных озер Танатар (Алтайский край). Показано, что штаммы Z-910 и Z-710 способны гидролизовать *para*-нитроанилидные субстраты, проявляя максимальную активность по гидролизу GIpAALpNA и LpNa. Установлено, что пептидазы наиболее активны в щелочных условиях при pH 8–10 и термостабильны до 50°C. Данные ингибиторного анализа и субстратной специфичности изученных внеклеточных ферментов указывают на их принадлежность к классам сериновых пептидаз субтилизин-подобного типа (штамм Z-910) и металлопептидаз аминокпептидазного типа (штамм Z-710).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-04-00236, частично в рамках госзадания

ФИЦ Биотехнологии РАН при финансировании Министерства науки и высшего образования РФ и частично в рамках госзадания АААА-А17-117011810034-9 для ФГБУН ИОЭБ СО РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Болтыанская Ю.В., Кевбрин В.В.* Трофические взаимодействия протеолитической бактерии *Proteinivorax tanatarense* в алкалофильном микробном сообществе // *Микробиология*. 2016. Т. 85. № 4. С. 458–465.
- Boltyanskaya Y.V., Kevbrin V.V.* Trophic interactions of proteolytic bacteria *Proteinivorax tanatarense* in an alkaliphilic microbial community // *Microbiology (Moscow)*. 2016. V. 85. P. 481–487.
- Boltyanskaya Y., Detkova E., Pimenov N., Kevbrin V.* *Proteinivorax hydrogeniformans* sp. nov., an anaerobic, haloalkaliphilic bacterium fermenting proteinaceous compounds with high hydrogen production // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2018. V. 111. P. 275–284.
- Brown L., Wolf J.M., Prados-Rosales R., Casadevall A.* Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. V. 13. P. 620–630.
- Chróst R.J.* Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes // *Microbial Enzymes in Aquatic Environments* / Eds. Chróst R.J. New York: Springer, 1991. Part 3. P. 29–59.
- 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.
- Kevbrin V., Boltynskaya Y., Zhilina T., Kolganova T., Lavrenjeva E., Kuznetsov B.* *Proteinivorax tanatarense* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, haloalkaliphilic, proteolytic bacterium isolated from a decaying algal bloom, and proposal of *Proteinivoraceae* fam. nov. // *Extremophiles*. 2013. V. 17. P. 747–756.
- Nguyen T.T.H., Myrold D.D., Mueller R.S.* Distributions of extracellular peptidases across prokaryotic genomes reflect phylogeny and habitat // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Article 413. P. 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00413>
- Ryzhmanova Y., Oshurkova V., Troshina O., Abashina T., Ariskina E., Avtukh A., Shcherbakova V.* *Anoxynatronum buryatiense* sp. nov., an anaerobic alkaliphilic bacterium from a low mineralization soda lake in Buryatia, Russia // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 4704–4709.
- Thakur N., Goyal M., Sharma S., Kumar D.* Proteases: Industrial applications and approaches used in strain improvement // *Biological Forum – An International J.* 2018. V. 10. P. 158–167.

Peptidase Activity of *Proteinivorax* Bacteria and Their Possible Ecological Role in the Microbial Communities of Tanatar Soda Lakes (Altai Krai, Russia)

E. V. Lavrentyeva^{1,2,*}, E. B. Erdyneeva¹, Ya. E. Dunaevskii³, Yu. V. Boltyanskaya⁴, and V. V. Kevbrin⁴

¹*Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, 670047 Russia*

²*Banzarov Buryat State University, Ulan Ude, 670000 Russia*

³*Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

⁴*Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*e-mail: lena_l@mail.ru

Received May 24, 2019; revised July 19, 2019; accepted July 29, 2019

Abstract—Peptidase activity of alkaliphilic anaerobic proteolytic *Proteinivorax* bacteria, *P. tanatarense* Z-910^T and *P. hydrogeniformans* Z-710^T, isolated from the Tanatar system of hypersaline alkaline lakes (Altai krai, Russia) was studied. Strains Z-910 and Z-710 were shown to hydrolyze *para*-nitroanilide substrates, exhibiting the highest activity hydrolyzing GIpAALpNA and LpNa. The peptidases were most active under alkaline conditions at pH 8–10 and were stable at temperatures of up to 50°C. The results on inhibitor analysis and substrate specificity of the studied extracellular enzymes suggested their classification as serine peptidases of the subtilisin-like type (strain Z-910) and metallopeptidases of the aminopeptidase type (strain Z-710).

Keywords: soda lakes, *Proteinivorax* proteolytic bacteria, substrate specificity, serine peptidase and metallo-peptidase