

УДК 577.151

СТАБИЛЬНОСТЬ СУБТИЛИЗИНОПОДОБНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ *BACILLUS INTERMEDIUS*

Е.О. Михайлова, М.Р. Каримова, М.Р. Шарипова

Аннотация

Поиск новых бактериальных протеаз, устойчивых к воздействию окислителей и денатурирующих веществ, остается актуальной проблемой. Показано, что две фракции субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius*, секретируемые рекомбинантным штаммом *B. subtilis* AJ73, сохраняют активность в присутствии восстановителей и окислителей (C_2H_5OH и H_2O_2) и при увеличении ионной силы раствора, но не стабильны в присутствии денатурирующего агента (SDS).

Введение

Протеолитические ферменты играют важную роль в мировой индустрии, широко использующей биологически активные микробные препараты. Разнообразие свойств протеаз позволяет применять их в практической медицине, пищевой технологии, фармацевтике, производстве кож, а также в качестве добавок к различным детергентам. История промышленного применения протеаз в составе моющих средств началась с создания препарата «Burnus» на основе панкреатической протеазы в 1913 г., а в 1956 г. был создан первый детергент ВЮ-40, содержащий бактериальный энзим. К настоящему моменту подавляющее большинство протеаз, входящих в состав всех известных моющих средств, – бактериальные сериновые протеазы [1].

Среди используемых бактериальных препаратов субтилизиноподобные сериновые протеиназы (субтилазы) – ферменты, широко распространенные в природе, которых насчитывается уже более 200 [2]. Молекулярная масса бактериальных субтилаз составляет 26–51 кДа. В каталитическую триаду активного центра этих ферментов входят аминокислотные остатки Asp-His-Ser. Субтилазы синтезируются внутриклеточно в виде предшественников – препроферментов, в состав которых входят сигнальный пептид, обеспечивающий секрецию белка, пропептид и собственно зрелый фермент [3]. Субтилизиноподобные протеиназы, обладая широкой субстратной специфичностью, стабильностью при высоких значениях pH, активностью в широком интервале температур, устойчивостью к хелатирующим и окисляющим агентам, идеально подходят для использования в составе детергентов.

Актуальным представляется поиск новых бактериальных субтилизиноподобных протеиназ, сохраняющих активность в присутствии окислителей, денатурирующих веществ, а также в растворах с высокой ионной силой.

1. Постановка задачи

Ген субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B. intermedius* клонирован на мульткопийной плазмиде pCS9 [4], его экспрессия изучена в рекомбинантном штамме *Bacillus subtilis*. Было показано, что накопление фермента *Bacillus intermedius* в культуральной жидкости *Bacillus subtilis* AJ73 достигает максимального значения на 28-й и 48-й ч роста и зависит от состава питательной среды [5]. Последовательность гена опубликована в Международном банке генов под номером AY754946.

Цель работы – анализ стабильности субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis* AJ73, на разных стадиях роста в присутствии окислителей, восстановителей, денатурирующих соединений и солей высоких концентраций.

2. Материалы и методы

В работе использовали две высокоочищенные фракции субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B. intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis* AJ73 на 28-й и 48-й ч роста культуры. Обе белковые фракции очищены методом, описанным в работе [6].

Специфическую активность фракций субтилизиноподобной протеиназы определяли по расщеплению хромогенного субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa по методу Люблинской и др. [7]. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующего в условиях эксперимента 1 мкМ субстрата за 1 мин. Удельную активность выражали в ед/мг белка.

Активность фракций фермента по отношению к Z-Ala-Ala-Leu-pNa в 0.05 М Tris-HCl-буфере в присутствии 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 2 и 5% SDS определяли при температуре 37°C, как описано выше. При этом активность фракций фермента определяли после прединкубации ферментных растворов с растворами SDS в течение 1 ч при температуре 37°C.

Для изучения влияния H₂O₂ на активность фракций фермента проводили прединкубацию растворов фермента в 0.05 М Tris-HCl-буфере, содержащем 10, 20 и 40 мМ H₂O₂ в течение 1 и 24 ч при температуре 37°C, далее добавляли раствор Z-Ala-Ala-Leu-pNa в 20%-ном ДМФА и определяли активность, как описано выше.

Изучение влияния этанола на активность протеиназ проводили в 0.05 М Tris-HCl-буфере, содержащем 5, 10, 25 и 50% C₂H₅OH. После прединкубации ферментных растворов с растворами этанола, активность определяли, как описано выше.

Для изучения влияния различных концентраций NaCl на стабильность фракций фермента проводили прединкубацию ферментативных растворов в 0.05 М Tris-HCl-буфере, содержащем 0.5, 1, 2, 5, 10, 15 и 20% NaCl, в течение 1 и 24 ч при температуре 37°C, далее добавляли раствор субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa в 20%-ном ДМФА и определяли активность, как описано выше.

3. Результаты и их обсуждение

Литературные данные свидетельствуют о существовании большого числа сериновых протеаз, стабильных при высоких концентрациях SDS, выступающего в роли сильного анионного ПАВ. Так, щелочная протеаза Rt4A2 из *Thermus* sp. сохраняет 78% активности в присутствии 1% SDS в течение 24 ч, а субтилизиноподобная протеаза Q (*B. pumilus*) сохраняет 50% активности даже в 10% SDS [8, 9]. Исследование влияния различных концентраций SDS на субтилизиноподобную протеиназу *B. intermedius*, секретируемую рекомбинантным штаммом *B. subtilis* на разных фазах роста, показало, что в присутствии данного денатурирующего агента в концентрации от 0.1 до 0.5% активность первой фракции практически не изменялась, однако в концентрации от 1 до 5% активность снижалась, более чем на 70% (рис. 1). Более существенное влияние SDS оказывал на вторую фракцию, активность которой значительно снижалась уже в присутствии 0.5% SDS. Преинкубация обеих белковых фракций в течение 1 ч с SDS в концентрации от 0.2 до 5% вела к полной потере активности исследуемых фракций фермента. Эти результаты сопоставимы с данными, полученными для щелочной протеазы NH1 (*B. licheniformis*), которая также сохраняла активность в 0.1% SDS и теряла около 20% активности в присутствии 0.5% SDS [10].

Устойчивость протеиназ не только к денатурирующим агентам, но и к окислителям является немаловажной деталью для их практического использования. Слабое звено всех субтилизинов – инактивация белковой молекулы за счет окисления метионина, расположенного непосредственно после серина каталитической триады [11]. В настоящее время известны субтилизиноподобные протеазы E-1, KP-9860, LP-Уа и другие субтилизины бацилл (*Bacillus* sp.), которые устойчивы к действию H_2O_2 [12]. Нами установлено, что первая и вторая фракции субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* сохраняли активность в присутствии 10 мМ H_2O_2 на уровне контроля, активность обеих фракций незначительно снижалась в присутствии 20 и 40 мМ H_2O_2 (рис. 2, а). Преинкубация обеих фракций субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* с 10 и 20 мМ H_2O_2 в течение 1 ч также не оказывала существенного влияния на активность обоих ферментов, но при концентрации 40 мМ активность ранней протеиназы снижалась уже на 40% (рис. 2, б). Преинкубация белков с H_2O_2 в течение 24 ч при концентрации 10 мМ понижала активность на 80%, а при концентрациях 20 и 40 мМ – более чем на 90% (рис. 2, в). Полученные данные не противоречат результатам, полученным для других протеаз, таких как протеаза NH1, которая активна в присутствии 1–5% H_2O_2 , щелочная протеаза из *Bacillus clausii* I-52 сохраняла активность в присутствии 10% H_2O_2 [10, 13].

Рис. 3 демонстрирует влияние этанола на активность субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius*. Показано, что при низких концентрациях этанола активность первой фракции практически не снижалась, несколько большее влияние эти концентрации оказывали на активность второй фракции. Высокие концентрации C_2H_5OH (25, 50%) значительно подавляли активность обеих фракций протеиназы.

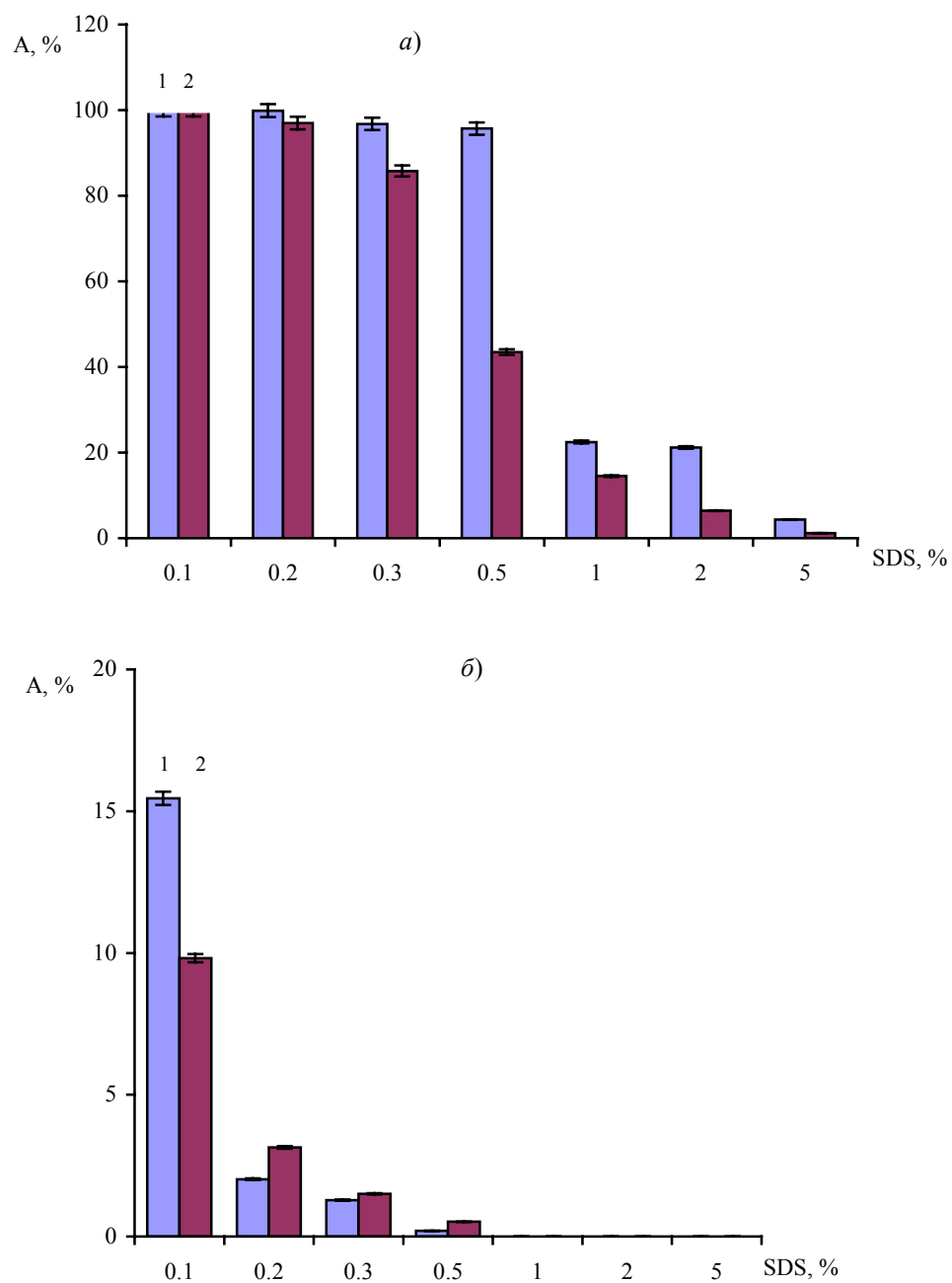


Рис. 1. Влияние SDS на активность субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis* AJ73 (среднее \pm стандартное отклонение): а – без прединкубации, б – с прединкубацией 1 ч: 1 – первая фракция, 2 – вторая фракция

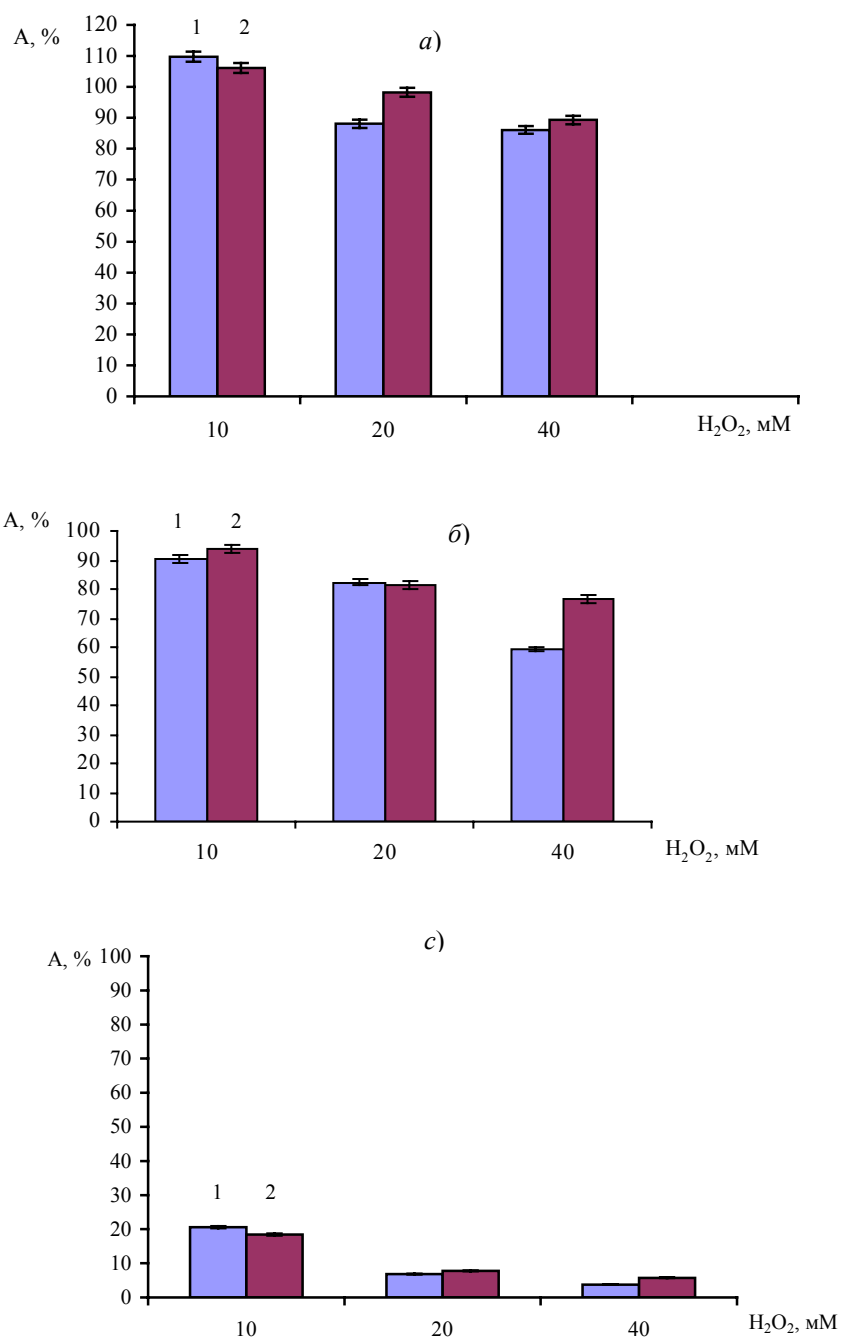


Рис. 2. Влияние H_2O_2 на активность фракций субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius*, секретируемых рекомбинантным штаммом *B. subtilis* AJ73 на разных фазах роста *a* – без прединкубации; *б* – прединкубация 1 ч; *с* – прединкубация 24 ч; 1 – первая фракция, 2 – вторая фракция

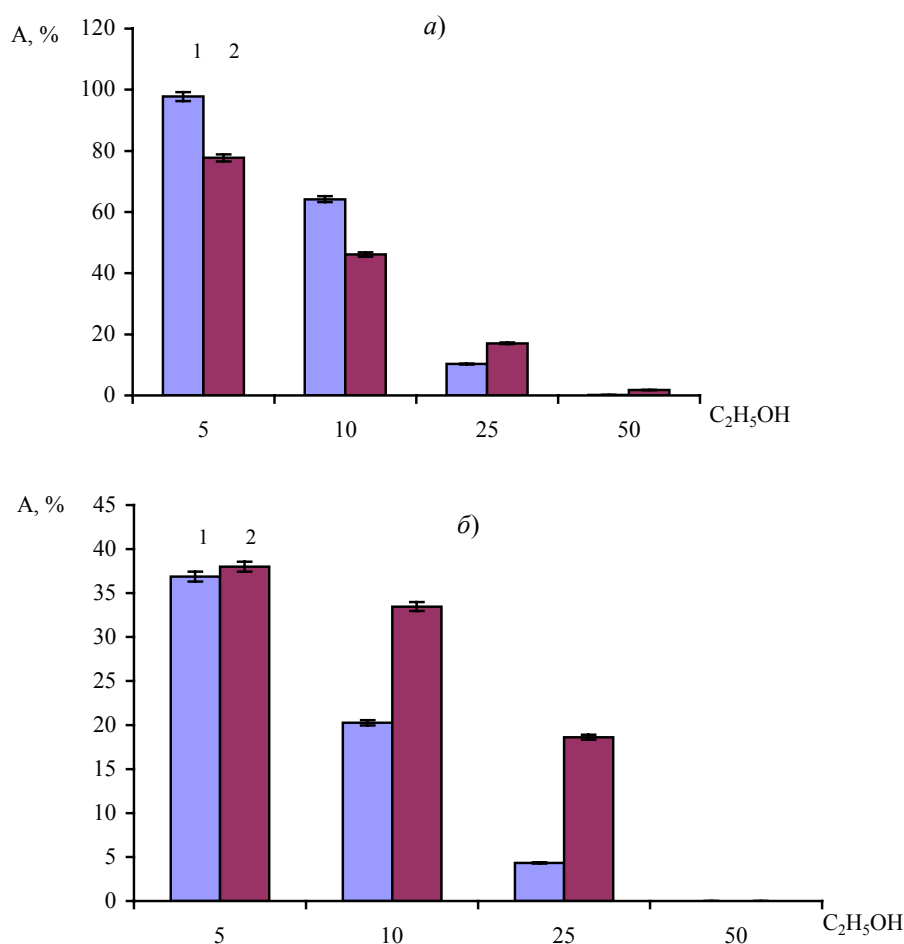


Рис. 3. Влияние C₂H₅OH на активность субтилизиноподобных протеиназ *B. intermedius*, секретируемых рекомбинантным штаммом *B. subtilis* AJ73 а – без прединкубация; б – прединкубация 1 ч; 1 – первая фракция, 2 – вторая фракция

Прединкубация ферментных растворов с этанолом в течение 1 ч приводила к потере активности обеих фракций протеиназы более чем на 50%, а при концентрации C₂H₅OH 50% подавлялась полностью. Аналогичные данные получены и для других субтилизинов (исландизин), активность которых не снижалась при низких концентрациях этанола [14].

Известно, что некоторые протеазы проявляют максимальную активность при высокой ионной силе. Это, в первую очередь, касается протеаз микроорганизмов, обитающих в экстремальных условиях: при высокой температуре, высокой концентрации солей и т. д. Так, для достижения максимальной активности сериновой протеазы, продуцируемой *Halobacillus mediterranei*, необходимо 4.5 M NaCl [15]. При исследовании влияния NaCl на активность обеих фракций субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius*, секретируемой штаммом *B. subtilis* на разных стадиях роста, было обнаружено, что активность повыша-

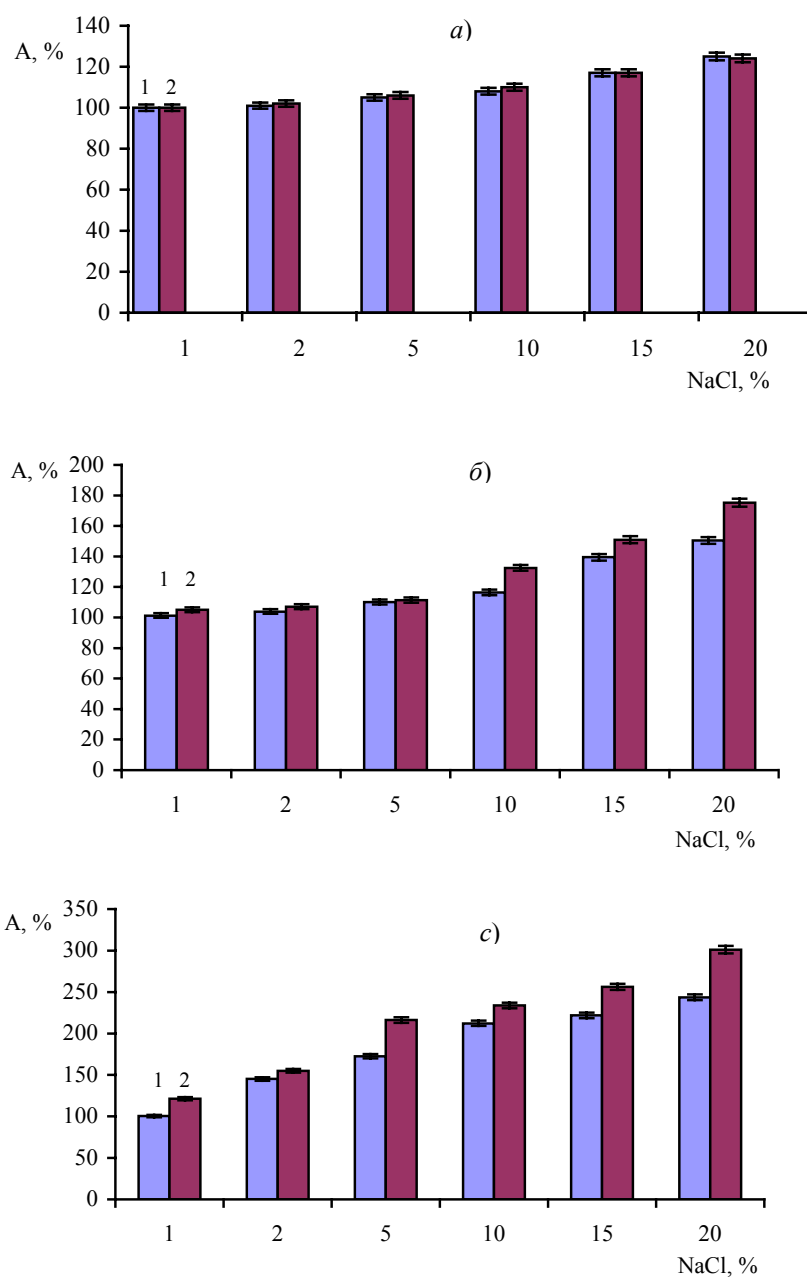


Рис. 4. Влияние NaCl на активность субтилизиноподобных протеиназ *B. intermedius*, секретируемых рекомбинантным штаммом *B. subtilis* AJ73: *a* – без прединкубации; *b* – прединкубация 1 ч; *c* – прединкубация 24 ч; 1 – первая фракция, 2 – вторая фракция

лась на 10–20% при концентрациях NaCl 15 и 20% (рис. 4, *a*). Однако прединкубация обеих фракций протеиназы с раствором NaCl концентрации уже 5 и 10% в течение 1 ч привела к повышению активности на 10–20%, а с раствором NaCl концентрации 15% – на 30% для первой и 40% для второй фракции. Пре-

динкубация с 20%-ным раствором NaCl приводила к повышению активности первой фракции на 50%, а второй – на 75% (рис. 4, б).

Прединкубация обеих фракций фермента с 10–20%-ными растворами NaCl в течение 24 ч позволила повысить активность первой фракции в 2 раза, а второй – в 2.5–3 раза (рис. 4, с). Это свидетельствует о том, что повышение ионной силы ведет к увеличению активности субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius*. Таким образом, субтилизиноподобная протеиназа *B. intermedius* является галофильным ферментом. Подобные примеры известны и для других сериновых протеаз, например, протеазы из *Halobacillus* sp. SR5-3, также активируемой высокими концентрациями NaCl [16].

Таким образом, две фракции субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius*, секретируемые рекомбинантным штаммом *B. subtilis* AJ73, не стабильны в присутствии денатурирующего агента (SDS), однако сохраняют высокий уровень активности при взаимодействии с восстановителями и окислителями (C₂H₅OH и H₂O₂). Увеличение ионной силы также ведет к повышению активности протеиназы. Полученные данные могут служить основой для практического использования этого фермента, стабильность которого сравнима с известными промышленными продуцентами.

Summary

E.O. Mikhailova, M.R. Karimova, M.R. Sharipova. Stability of Bacillus intermedius subtilisin-like proteinase.

The search of new bacterial proteases stable against influence of oxidative and denaturing agents remains an actual problem. It was shown that two fractions of subtilisin-like proteinase *B. intermedius*, secreted by recombinant strain *B. subtilis* AJ73 keep activity at presence of oxidizers (C₂H₅OH and H₂O₂) and at increase in ionic strength of solution, but are not stable in presence of denaturants (SDS).

Литература

1. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1998. – V. 62, No 3. – P. 597–635.
2. Siezen R.J., Leunissen J.A. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases // *Protein. Sci.* – 1997. – V. 6, No 3. – P. 501–523.
3. Wells J.A., Ferrari E., Henner D.J., Estell D.A., Chen E.Y. Cloning, sequencing and secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin in *Bacillus subtilis* // *Nucleic acids.* – 1983. – V. 11. – P. 7911–7925.
4. Sharipova M., Balaban N., Kayumov A., Kirillova Y., Mardanova A., Leschinskaya I., Rudeskaya G., Akimkina T., Safina D., Demidyuk I., Kostrov S. The expression of the serine proteinase gene of *B. intermedius* in *B. subtilis* // *Microbiol. Res.* – 2006. – In press.
5. Кириллова Ю.М., Михайлова Е.О., Марданова А.М., Балабан Н.П., Каюмов А.Р., Руденская Г.Н., Костров С.В., Шарипова М.Р. Условия роста культуры и биосинтеза субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* // *Микробиология.* – 2006. – Т. 73, № 2. – С. 1–7.
6. Михайлова Е.О., Марданова А.М., Балабан Н.П., Руденская Г.Н., Шарипова М.Р. Выделение и характеристика субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus interme-*

- dius*, секретлируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* AJ73 на разных фазах роста бацилл // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 2. – С. 228–235.
7. Люблинская Л.А., Воюшина Т.Л., Степанов В.М. p-Нитроанилиды пироглутамил-пептидов – хромогенных субстратов сериновых протеиназ // Биоорганическая химия. – 1987. – Т. 13, № 6. – С. 748–753.
 8. Freeman S.-A., Peek K., Prescott M., Daniel R. Characterization of a chelator-resistant proteinase from *Thermus* strain Rt4A2 // Biochem. J. – 1993. – V. 295. – P. 463–469.
 9. Han X.Q., Damodaran S. Stability of protease Q against autolysis and in sodium dodecyl sulfate and urea solutions // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1997. – V. 240, No 3. – P. 839–843.
 10. El Hadj-Ali N., Agrebi R., Ghorbel-Frikha B., Sellami-Kamoun A., Kanoun S., Nasri M. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1 // Enzyme and microbial technology. – 2007. – V. 40, No 4. – P. 515–523.
 11. Bott R., Ultsch M., Kossiakoff A., Graycar T., Katz B., Power S. The three-dimensional structure of *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin 1.8 Å and an analysis of the structural consequences of peroxide inactivation // J. Biol. Chem. – 1988. – V. 263. – P. 7895–7906.
 12. Saeki K., Okuda M., Hatada Y., Kobayashi T., Ito S., Takami H., Horikoshi K. Novel oxidatively stable subtilisin-like serine proteases from alkaliphilic *Bacillus* spp.: enzymatic properties, sequences, and evolutionary relationships // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2000. – V. 279, No 2. – P. 313–319.
 13. Joo H.S., Kumar C.G., Park G.C., Paik S.R., Chang C.S. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties // J. Appl. Microbiol. – 2003. – V. 95, No 2. – P. 267–272.
 14. Godde C., Sahm K., Brouns S., Kluskens L.D., van der Oost J., de Vos W.M., Antranikian G. Cloning and expression of islandisin, a new subtilisin from *Fervidobacterium islandicum*, in *Escherichia coli* // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V. 71, No 7. – P. 3951–3958.
 15. Stepanov V.M., Rudenskaya G.N., Revina L.P., Gryaznova Y.B., Lysogorskaya E.N., Filippova I.Y., Ivanova I.I. A serine proteinase of an archaeobacterium *Halobacterium mediterranei*. A homologue of eubacterial subtilisins // Biochem. J. – 1992. – V. 285. – P. 281–286.
 16. Namwong S., Hiraga K., Takada K., Tsunemi M., Tanasupawat S., Oda K. A halophilic serine proteinase from *Halobacillus* sp. SR5-3 isolated from fish sauce: purification and characterization // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2006. – V. 70, No 6. – P. 1395–1401.

Поступила в редакцию
21.02.07

Михайлова Екатерина Олеговна – аспирант кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: katya_o_m@rambler.ru

Каримова Мадина Рафаэлевна – студент кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

Шарипова Маргарита Рашидовна – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: Margarita.Sharipova@ksu.ru