

УДК 579.222, 577.151

ЛИПОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ КРИОПЭГОВ ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ

© 2012 г. Л. Е. Петровская, К. А. Новотоцкая-Власова, Е. В. Спирина, Г. В. Хохлова,
Е. М. Ривкина, Д. А. Гиличинский, Д. А. Долгих, академик М. П. Кирпичников

Поступило 22.03.2012 г.

Вечная мерзлота, занимающая около 26% поверхности Земли и 50% территории России, представляет собой уникальную экологическую нишу, для которой характерно одновременное воздействие постоянных отрицательных температур, фоновой ионизирующей радиации, низкой активности воды и ограниченности питательных веществ на протяжении геологически значимого отрезка времени. Различными исследователями доказана способность про- и эукариотических микроорганизмов сохранять жизнеспособность в вечной мерзлоте [1], в том числе в криопэгах, представляющих собой незамерзшие отрицательно температурные линзы высокоминерализованных вод в толщах многолетнемерзлых осадочных пород морского происхождения [2].

Изучение физиологических основ выживаемости микроорганизмов в условиях, характерных для вечной мерзлоты, способствует расширению представления о пространственных и временных границах биосферы, а также обнаружению биологически активных веществ с новыми свойствами для использования в биотехнологии, например жирных кислот, пигментов, веществ с антимикробной активностью и белков, в том числе ферментов [3].

Холодоактивные ферменты обладают повышенной активностью при низких температурах и более высокой аффинностью к субстратам, что способствует увеличению каталитической эффективности и скорости проводимых ими реакций. Большой интерес вызывает применение таких ферментов в биотехнологии. В частности, холодоактивные липазы и эстеразы, которые являются

катализаторами в реакциях гидролиза триацилглицеридов до глицерина и жирных кислот, могут быть использованы в легкой и пищевой промышленности, а также в тонком химическом синтезе термолabile соединений и для биоремедиации загрязненных территорий Севера.

С целью обнаружения продуцентов холодоактивных липолитических ферментов в образцах криопэгов Колымской низменности, п-ова Ямал и мыса Барроу (Аляска) (табл. 1) нами были использованы как традиционный микробиологический подход, включающий выделение в чистую культуру отдельных представителей микробных сообществ, обладающих желаемой активностью, так и современные генноинженерные и биоинформационные методы.

В результате применения этих подходов из образцов криопэгов выделены и частично охарактеризованы культуры аэробных галофильных микроорганизмов – продуцентов липолитических ферментов. Были клонированы гены двух наиболее интересных ферментов – холодоактивных липаз *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T, получены миллиграммовые количества белков и проведено исследование их физико-химических свойств.

Выделение культур из криопэгов проводили методом накопительного культивирования при 4 и 20°C на стандартных питательных средах R2A и 1/2 TSB (“Difco”) с добавлением NaCl в конечной концентрации 100–250 г/л. В результате работы в чистую культуру выделен 51 штамм микроорганизмов, представленных в основном пигментированными грамположительными кокками и палочками. Для 36 штаммов проведено частичное определение нуклеотидных последовательностей 16S рДНК путем прямого секвенирования фрагментов ДНК, полученных в реакции ПЦР с использованием универсальных бактериальных праймеров BACT 8-27F (AgAgTTTgATC(C/A)TggCTCAg) и 1510-1492R ((A/C)g(C/T)TACCTgTTACgACTT) (“Евроген”) и Taq-полимеразы (“Fermentas”). Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с имеющимися в базах данных RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>) и GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с

*Институт биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии наук, Москва*

*Институт физико-химических и биологических проблем
почвоведения Российской Академии наук,
Пушино Московской обл.*

*Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова*

Таблица 1. Основные характеристики исследованных образцов

№ образца	Место отбора	Глубина, м	Возраст образца, тыс. лет	Минерализация, г/л
1	Колымская низменность, скв. 15/99	40	Средний плейстоцен, 100–120	160
2	Колымская низменность, скв. 15/99	40	Средний плейстоцен, 100–120	160
3	Скважина в устье р. Ярояха (п-ов Ямал)	5	Голоцен, 5–7	58
4	Пойма р. Ярояха, скв. 1 (п-ов Ямал)	7.5	Голоцен 5–7	70
5	Бованенковское газовое месторождение (п-ов Ямал), скв. 65П	120	Средний плейстоцен, 100–120	31
6	Мыс Барроу, Аляска	50	Поздний плейстоцен, 40–50	158

Таблица 2. Характеристики выделенных штаммов, обладающих липолитической активностью

Название культуры	№ образца	Ближайший гомолог в GenBank (по данным анализа 16S рДНК)	Гомология, %	Тест на липолитическую активность при росте на среде 1/2 TSB, содержащей			
				трибутирин	трибутирин + 100 г/л NaCl	родамин Б + оливковое масло	родамин Б + оливковое масло + 100 г/л NaCl
П-15-99-R1	2	<i>Brevibacterium</i> sp. (JF970576)	98	–	–	+	–
LYa-T10	3	Uncultured bacterium (FN563257)	99	–	–	+	–
LYa-T5	3	<i>Brevibacterium</i> sp. (EF612292)	98	–	–	+	–
YaCP-T2	4	<i>Brevibacterium</i> sp. (JF970576)	97	–	+	–	–
YaCP-T20	4	<i>Citricoccus</i> sp. (AM111007)	99	+	–	–	+
YaCP-T29	4	<i>Citricoccus</i> sp. (AB594473)	99	+	+	+	+
YaCP-T38	4	<i>Brevibacterium</i> sp. (EF612292)	98	–	–	+	–
YaCP-T40	4	<i>Dietzia</i> sp. (DQ448696)	100	+	+	–	–
YaCP-T44	4	<i>Brevibacterium</i> sp. (JF970576)	99	+	+	+	–
BSP-T1	5	<i>Dietzia</i> sp. (FJ435351)	99	+	+	+	–
AL-R1	6	<i>Citricoccus</i> sp. (AB272821)	99	–	–	+	+
Al-T3f	6	<i>Arthrobacter</i> sp. (GQ495069)	96	–	–	+	+
Al-T7	6	<i>Lacticigenium naphthae</i> (NR_041685)	99	–	–	+	+
Al-T9	6	<i>Citricoccus nitrophenolicus</i> (GU797177)	99	–	+	+	+
Al-T13	6	<i>Citricoccus</i> sp. (AB189330)	100	+	+	–	–
Al-T17	6	<i>Citricoccus nitrophenolicus</i> (GU797177)	99	–	–	+	+

использованием программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Скрининг на липолитическую активность проводили, как описано в [4].

Результаты работы показали, что наиболее перспективными для выделения продуцентов липолитических ферментов являются криопэги в устье р. Ярояха и мыса Барроу (табл. 1, 2). Из 16 штаммов, обладающих липолитической актив-

ностью, 6 штаммов выделены из образца № 4 и 6 штаммов – из образца № 6.

Большую часть полученных штаммов на основании гомологии последовательностей 16S рДНК можно отнести к классу Actinobacteria, порядку Actinomycetales и родам *Citricoccus*, *Dietzia* и *Brevibacterium*. Степень гомологии с имеющимися в базах данных последовательностями составляет от 96 до 100%; таким образом можно предпо-

ложить, что некоторые из выделенных нами штаммов представляют собой новые виды.

С помощью аналогичных тестов обнаружена липолитическая активность штамма *P. Cryohalolentis* K5^T, выделенного ранее из образца № 1 [5]. Поиск гомологов липаз родственных микроорганизмов [6, 7] в геноме этой бактерии [http://www.

genome.jp/dbgetbin/www_bget?gn:T00350] с помощью программы BLAST привел к идентификации двух целевых генов (*EstPc* и *LipPc*), которые были экспрессированы в клетках *E. coli* для изучения соответствующих белков. С этой целью проводили ПЦР с использованием геномной ДНК *P. cryohalolentis* в качестве матрицы и двух пар ген-специфических праймеров:

Pc0023F 5'-АТААТАСАТАТГАТАААТАССАССААААГАТТАТТС,
Pc0023R 5'-АСАТГТССАТТСТТТААСССТТССАССААААА,
Pc2458F 5'-АТААТАСАТАТГТСТААСТСААССАААААААААА,
Pc2458R 5'-АСАТГТССАТТСТТТААСССТТССАССАААААААААА.

Полученные фрагменты клонировали в вектор рЕТ32а, в результате чего были сконструированы плазмиды рЕТ-*EstPc* и рЕТ-*LipPc*. Рекombинантные белки, полученные в результате экспрессии в клетках *E. coli* BL21(DE3), были очищены с помощью Ni-аффинной хроматографии на колонке Ni-Sepharose FastFlow ("GE Healthcare"). Липолитическую активность *EstPc* и *LipPc* определяли, как описано в работе [8].

В результате электрофоретического анализа в SDS-ПААГ биомассы штаммов-продуцентов после индукции 0.1 мМ ИПТГ (изопропилтиогалактозид) установлено, что целевые гены *EstPc* и *LipPc* эффективно экспрессируются в клетках *E. coli* (рис. 1, дорожки 3, 6). Подвижность очищенных рекомбинантных белков *EstPc* и *LipPc* соответствует рассчитанным молекулярным массам

(около 33 и 54 кДа соответственно, рис. 1, дорожки 4, 7).

Температурный оптимум активности белка *LipPc*, который проявляет более высокую активность по отношению к субстратам с относительно длинной углеводородной цепью, составляет 25°C; при более низких температурах активность сохраняется на уровне 65–95% от максимальной. Для *LipPc* характерна типичная для холодоактивных белков нестабильность при повышенных температурах; так, даже кратковременный прогрев его при 50°C приводит к полной потере активности (рис. 2). Присутствие в реакционной смеси NaCl не влияет на активность данного белка.

Белок *EstPc* может быть отнесен к эстеразам, поскольку лучше утилизирует субстраты с короткой и средней углеводородной цепью. Он проявляет максимальную ферментативную активность при температуре 35°C; его активность при температурах 5–30°C составляет около 90% от максимальной. Присутствие NaCl в реакционной смеси повышает активность *EstPc* более чем на 70%.

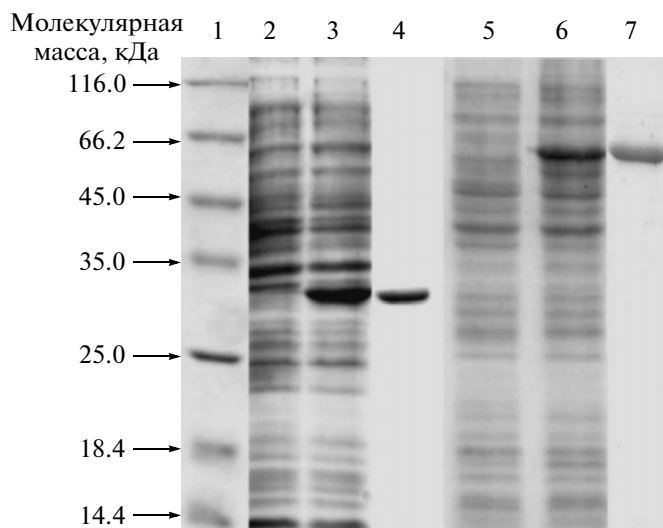


Рис. 1. Экспрессия генов *EstPc* и *LipPc* и выделение рекомбинантных белков. 1 – маркер молекулярной массы белков ("Fermentas"); 2, 3, 5, 6 – тотальный клеточный белок из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидами рEstPc (2, 3) или рLipPc (5, 6), без индукции (2, 5) и с индукцией 0.1 мМ ИПТГ (3, 6); 4, 7 – очищенные рекомбинантные белки *EstPc* и *LipPc*.

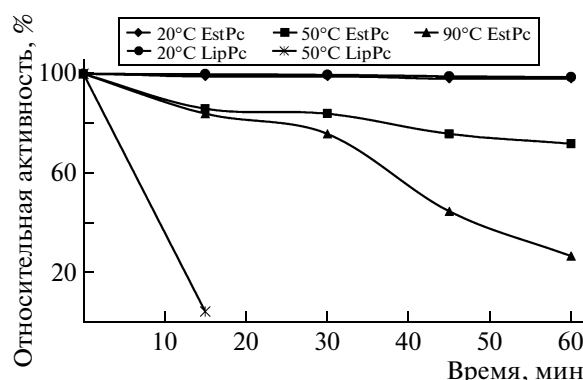


Рис. 2. Термостабильность белков *EstPc* и *LipPc*. Ферменты инкубировали в реакционной смеси, содержащей 50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, при указанных температурах в течение 15, 30, 45 и 60 мин, остаточную активность измеряли после инкубации с 0.25 мМ паранитрофенилбутиратом в качестве субстрата в течение 15 мин при 25°C.

При этом в отличие от большинства холодоактивных ферментов EstPc демонстрирует относительно высокую термостабильность: он сохраняет около 50% активности после инкубации в течение 45 мин при 90°C (рис. 2). Эти свойства делают EstPc перспективным объектом для практического применения в биотехнологии. Большой интерес представляет также структурное исследование EstPc с помощью методов рентгеноструктурного анализа или ЯМР, так как этот белок не имеет близких гомологов с известной пространственной структурой.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами создана коллекция, содержащая 16 перспективных штаммов-продуцентов липолитических ферментов из криопэггов Арктики. Получены в очищенном виде и охарактеризованы две холодоактивные липазы микроорганизма *P. cryohalolentis* K5^T. В ближайшее время мы планируем провести полномасштабное структурное исследование белка EstPc.

Авторы выражают благодарность проф. В.Е. Романовскому (Университет Аляски) за предоставленный образец № 6 и В.В. Щербаковой (ИБФМ РАН) за культуру *P. cryohalolentis* K5^T.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 10–05–00079 и программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gilichinsky D., Vorobyova E., Erokhina L., et al.* // *Adv. Space Res.* 1992. V. 12. № 4. P. 255–263.
2. *Gilichinsky D., Rivkina E., Bakermans C., et al.* // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005. V. 53. № 1. P. 117–128.
3. *Margesin R., Schinner F., Marx J., Gerday C.* *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology.* B.; Heidelberg: Springer, 2008.
4. *Hasan F., Shah A., Hameed A.* // *Biotechnol. Adv.* 2009. V. 27. № 6. P. 782–798.
5. *Bakermans C., Ayala-del-Rio H., Ponder M., et al.* // *Intern. J. Syst. Evolut. Microbiol.* 2006. V. 56. Pt 6. P. 1285–1291.
6. *Kulakova L., Galkin A., Nakayama T., et al.* // *Biochim. et biophys. acta.* 2004. V. 1696. № 1. P. 59–65.
7. *Arpigny J., Feller G., Gerday C.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1993. V. 1171. № 3. P. 331–333.
8. *Chen R., Guo L., Dang H.* // *World J. Microbiol. and Biotechnol.* 2011. V. 27. № 2. P. 431–441.