

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК

№ 2

КИЕВ — 198 *9*

АМИНОПЕПТИДАЗА ТЕРМОФИЛЬНОГО ШТАММА *BACILLUS LICHENIFORMIS*

И. Н. Павлова, Т. В. Ротанова, Л. Г. Жолнер

Ин-т микробиологии и вирусологии АН УССР, Киев;
Ин-т биоорган. химии АН СССР, Москва

Из культуральной жидкости термофильного штамма *Bacillus licheniformis* выделена и очищена аминоксептидаза, отщепляющая предпочтительно N-концевой лейцин в коротких пептидах, а также гидролизующая лейцинамид. Фермент имеет молекулярную массу, близкую к 60 кдальтон, и способен образовывать агрегаты.

Аминоксептидаза максимально активна при pH 8,0—8,3 и температуре 85°C. Фермент инактивируют металлосвязывающие реагенты и редуцирующие вещества, тогда как ионы кобальта и ПХМБ являются его активаторами. Активность фермента, инактивированного ЭДТА, восстанавливается ионами кобальта и цинка, однако последний не обладает активирующим действием.

Исследуемый фермент характеризуется высокой термостабильностью: в присутствии субстрата при температуре 90°C линейность реакции сохраняется не менее 2 ч, а без субстрата время полуинактивации аминоксептидазы при 90°C составляет 145 мин.

Внеклеточная аминоксептидаза термофильного штамма *B. licheniformis* представляет собой новый фермент, отличающийся от описанных к настоящему времени аминоксептидаз высокой термостабильностью, обусловливаемой, вероятно, присутствием в молекуле фермента одной или нескольких дисульфидных связей.

Бактерии рода *Bacillus* характеризуются набором высокоактивных секреторных протеолитических ферментов, осуществляющих деструкцию разнообразных белковых субстратов, в том числе и с образованием свободных аминокислот. В то время как эндопептидазы (субтилизины и металлотазисимые протеиназы) исследованы глубоко и всесторонне, экзопептидазам уделяется меньше внимания. Эти ферменты, как правило, являются внутриклеточными, но у некоторых бацилл (возможно, в определенных условиях) они секретируются клетками. К настоящему времени наиболее подробно исследованы внутриклеточные аминоксептидазы *Bacillus subtilis* и *B. stearothermophilus* и лишь небольшое количество работ посвящено внеклеточным аминоксептидазам бацилл [1, 8, 12, 13, 17].

Способность гидролизовать небольшие пептиды была обнаружена нами у термофильного штамма *B. licheniformis* [3]. Она обусловлена активностью внеклеточных экзопептидаз, отщепляющих концевые аминокислоты. При этом отщепление N-концевых аминокислот происходило значительно активнее, чем аминокислот со свободной карбоксильной группой. Выделению, очистке и изучению свойств фермента, определяющего аминоксептидазную активность указанного штамма, и посвящена настоящая работа.

Материал и методы. Термофильный штамм *B. licheniformis* культивировали при 45°C глубинным способом на качалках на среде следующего состава (в г/л): сухие клетки пекарских дрожжей — 20; KH_2PO_4 — 1; MgSO_4 — 2.

Выделение активного материала из культуральной жидкости осуществляли путем высаливания сернокислым аммонием (80% насыщения).

Этапы очистки аминоксептидазы:

1. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Отдигализованный против воды и лиофильно высушенный ферментный препарат (около 500 мг) растворяли в 50 мМ трис-НСI-буфере pH 7,5 и наносили на колонку размером 1,5×23 см. Элюцию осуществляли тем же буфером со скоростью 25 мл/ч.

2. Хроматография на бацитрацин-силохроме. Белковый материал, не сорбированный на ДЭАЭ-целлюлозе в указанных выше условиях и содержащий аминоксептидазу, наносили на колонку размером 3×4 см. Элюцию осуществляли 50 мМ трис-НСI-буфером pH 8,5 со скоростью 300 мл/ч.

3. Гель-хроматография на TSK-геле HW-55 («Toyo-Soda», Япония). Материал, не связанный с бацитрацин-силохромом и проявляющий аминоксептидазную активность, подвергали гель-хроматографии на TSK-геле, сконцентрировав его предварительно в 10 раз на роторном испарителе. Размер колонки 1,2×46,0 см, элюцию проводили в 50 мМ трис-НСI-буфере pH 7,5 с 1 М NaCl со скоростью 30 мл/ч.

На всех этапах очистки аминоксептидазы осуществляли контроль аминоксептидазной и протеолитической активности. При этом первую из них определяли нингидриновым методом [9] с использованием в качестве субстрата 1 мМ раствора лейцил-глицил-глицина (Leu-Gly-Gly). Общую активность эндопептидаз(ы) определяли по мето-

ду Ансона в модификации Петровой [6]. Субстратом служил 1 %-й раствор казеина по Хаммерстену.

При исследовании физико-химических свойств аминопептидазы термофильной спорообразующей бактерии *B. licheniformis* активность определяли по гидролизу хромогенного субстрата — п-нитроанилида лейцина (Leu-pNA). Реакционная смесь содержала (если не указано иначе) 50 мкл ферментного раствора (30—50 мкг белка), 50 мкл 2,5 М раствора Leu-pNA и 50 мМ трис-HCl-буфер pH 7,5 до общего объема 1500 мкл. Температура реакции составляла 60 °С (если не указано иначе), время реакции — 10 мин. Об активности судили по изменению оптической плотности реакционной смеси вследствие освобождения п-нитроанилина (405 нм, 1-сантиметровая кювета). Количество окрашенного продукта рассчитывали, исходя из значения его коэффициента молярной экстинкции 9620 М⁻¹ см⁻¹. За единицу активности принято количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль п-нитроанилина в условиях опыта за 1 мин.

Влияние состава и pH буфера на активность аминопептидазы исследовали в 50 мМ трис-ацетатном, ацетатном, цитратно-фосфатном и трис-HCl-буферных растворах в области значений pH от 5,0 до 9,5.

При изучении влияния ряда веществ различной природы на активность аминопептидазы ферментный раствор преинкубировали с эффектором в концентрации 1 мМ (если не указано иначе) в течение 30 мин при 60 °С, после чего прибавляли в пробу субстрат и определяли активность фермента в стандартных условиях. В качестве эффекторов были исследованы ионы двухвалентных металлов; анионы, входящие в наиболее часто применяемые буферные смеси; вещества, связывающие двухвалентные металлы; реагенты на SH-группы; вещества, восстанавливающие дисульфидную связь, и ингибиторы ферментов, содержащих серин в активном центре. Влияние ионов двухвалентных металлов определяли после диализа ферментного раствора против 1 мМ раствора ЭДТА в течение 20 ч с последующим диализом раствора от избытка ЭДТА против воды.

Концентрацию белка в растворах определяли по методу Лоури.

Молекулярную массу определяли методом гель-фильтрации [7] на TSK-геле HW-55 (50 мМ трис-HCl-буфер pH 8,3 с 0,1 М NaCl). Колонку калибровали бычьим сывороточным альбумином (66 кдальтон), овальбумином (45 кдальтон), химиотрипсиногеном (25 кдальтон) и цитохромом С (12,3 кдальтон).

Электрофорез в ПААГ проводили в пластинках с 7,5 %-м гелем и 1 %- додецилсульфатом Na в щелочной системе (pH 8,6). Белковые полосы окрашивали кумасси-бриллиант-голубым G-250.

Определение K_m проводили графическим методом [2]. Из графика зависимости двойных обратных величин (Лайнуивера—Берка) была рассчитана максимальная скорость (V_{max}). При определении K_m и V_{max} количество субстрата в пробе варьировало от 12,5 до 125 нмоль.

Константы ингибирования для ДТТ, ЭДТА и о-фенантролина были рассчитаны по формуле:

$$\frac{V_0}{V_i} = 1 + \frac{[I]}{K_i},$$

где V_0 — начальная скорость реакции в отсутствие ингибитора, ед/мин; V_i — начальная скорость реакции в присутствии ингибитора, ед/мин; $[I]$ — концентрация ингибитора, М; K_i — константа ингибирования, М [2].

Результаты и их обсуждение. Фермент, отщепляющий концевую аминокислоту со свободной аминогруппой, был выделен из смеси внеклеточных белков термофильной бациллы, т. е. из неочищенного ферментного препарата, полученного при высаливании белков сернокислым аммонием, путем колоночной хроматографии. Следует сказать, что ряд балластных белков и коричневый пигмент были удалены из ферментного препарата на этапе хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. На всех этапах очистки этого фермента вели контроль не только аминопептидазой, но и казеинолитической активности. Последнее вызвано тем, что особенно важным было отделение аминопептидазы от сериновой протеиназы, активный биосинтез которой осуществляется термофильной *B. licheniformis* [5]. А так как для этой протеиназы, как и для других субтилизиннов, характерна широкая специфичность [3], нельзя было исключать возможность, что гидролиз низкомолекулярного субстрата является следствием действия сериновой протеиназы.

Отделение аминопептидазы от протеиназы было достигнуто при хроматографии на бацитрацин-силохроме: если сериновая протеиназа полностью связывалась с бацитрацином своим специфическим лигандом, то до 80 % аминопептидазой активности, нанесенной на колонку, элюировалось со стартовым буфером (фракция 1, именуемая далее фракцией Бцс-1).

Дальнейшую очистку аминопептидазы осуществляли на TSK-геле HW-55. При этом фракция Бцс-1 разделилась на три белковых пика, и в первых двух обнаруживали аминопептидазную активность (рис. 1). Оказалось, что гомогенным (при электрофорезе в денатурирующей системе) является только материал 2-го пика, содержащий основную часть активности. Он соответствует белку с молекулярной массой 60 кдальтон, тогда как в 1-м пике содержится белок с молекулярной массой 110 кдальтон (по данным гель-фильтрации на колонке TSK-геля). Известно, что некоторые аминопептидазы бацилл образуют субъ-

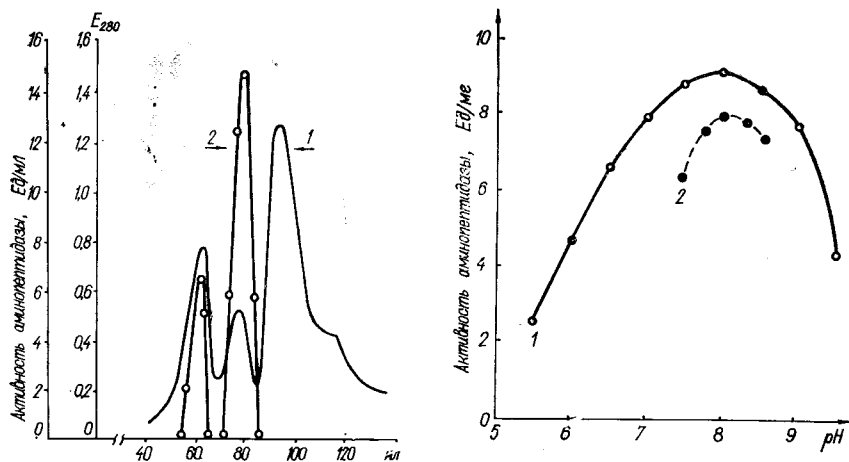


Рис. 1. Разделение аминопептидазы на TSK-геле HW-55. 1 — элюиционный профиль, E_{280} ; 2 — активность аминопептидазы.

Рис. 2. Влияние pH на активность аминопептидазы. 1 — трис-ацетатный буфер; 2 — трис-HCl-буфер.

единичные структуры [16] или агрегаты [1]. Поэтому можно предполагать, что в 1-м белковом пике находится димер исследуемой аминопептидазы.

Основные этапы очистки аминопептидазы представлены в таблице. Работу по исследованию физико-химических свойств аминопептидазы проводили с гомогенным материалом 2-го пика.

Установлено, что фермент активен при pH 5,5—9,5, причем область оптимальных значений pH находится между 7,5 и 8,5 (рис. 2). Активность фермента зависела не только от концентрации водородных ионов, но и в определенной степени от состава буфера: ион цитрата в 50 мМ

Очистка аминопептидазы *B. licheniformis*

Препарат, фракция	Объем, мл	Белок		Активность			Удельная активность, Ед на 1 мг белка	Очистка, количество раз
		мг/мл	Всего, мг	Ед/мл	Всего, Ед	Выход, %		
Культуральная жидкость	390	2,16	842,4	4,45	1735,5	100	2,06	1
Раствор ферментного препарата (осаждение сернокислым аммонием)	85	3,7	314,5	15,22	1293,7	74,5	4,11	2
ДЭАЭ-целлюлоза, фракция 1	250	0,61	152,5	4,08	1020,0	58,8	6,69	3,25
Бацитрацин-силохром, фракция 1	250	0,42	105,0	3,25	812,5	46,8	7,74	3,75
TSK-гель HW-55, фракция 1	40	0,638	25,52	3,275	131,0	7,54	5,19	2,5
TSK-гель HW-55, фракция 2	50	0,142	7,1	10,34	517,0	29,8	72,8	35,3

концентрации активировал фермент (~30%), ион хлора несколько снижал активность, а сульфат- и борат-ионы уже при концентрации 10^{-3} М подавляли активность аминопептидазы почти наполовину. Одновалентные катионы, обычно входящие в состав буферов, практически не влияли на фермент. Более чувствительным он оказался к действию ионов двухвалентных металлов. Диализ против ЭДТА (10^{-3} М) фракции Бис-1 снижал активность аминопептидазы в 2,5 раза. Активность можно было не только восстановить, но и значительно повысить ионами кобальта. Менее эффективными оказались ионы цинка (рис. 3). Слабое активирующее действие на фермент, обработанный ЭДТА, оказывали ионы меди

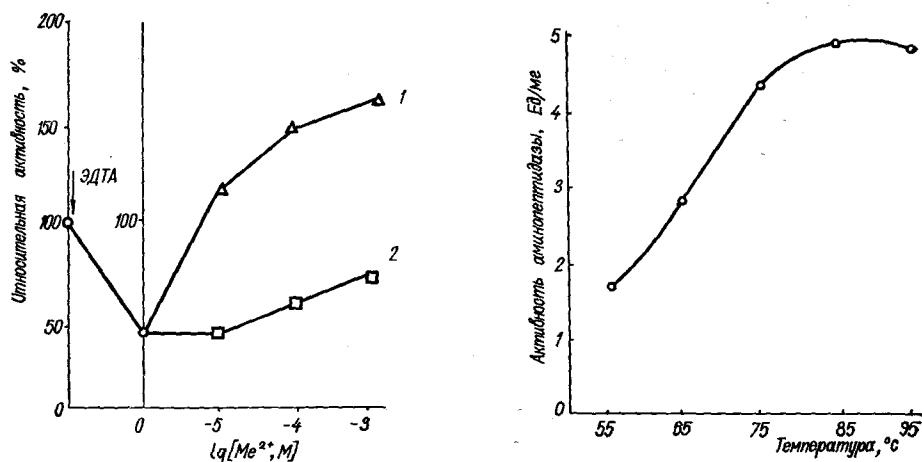


Рис. 3. Восстановление активности аминопептидазы, обработанной ЭДТА, ионами Co^{2+} (1) и ионами Zn^{2+} (2). Активность необработанной аминопептидазы 100%.

Рис. 4. Влияние температуры на активность аминопептидазы.

(наблюдаемый эффект был на порядок ниже, чем с ионами цинка) и кальция (на 15% ниже действия меди). Никакого влияния на активность аминопептидазы не оказывали ионы Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} .

При исследовании влияния температуры в интервале значений 30—95 °С на скорость гидролиза хромогенного субстрата аминопептидазой установлено, что температурный оптимум фермента находится в области 75—95 °С (рис. 4). При этом стабильность аминопептидазы в присутствии субстрата очень высока: так, при 90 °С линейность реакции не нарушалась в течение 120 мин. Прогревание аминопептидазы без субстрата в 50 мМ трис-НСI-буфере рН 8,0 в течение 4 ч при 70 °С вызывало снижение активности фермента на 25%, а время полуинактивации аминопептидазы при 90 °С составляло 145 мин. Менее стойким был фермент при рН выше 9,5 и в кислых растворах: при 60 °С фермент за 1 ч при рН 5,0 терял половину активности, а при рН 9,5—25%. Несмотря на то, что многие из аминопептидаз бацилл являются термостабильными белками, исследуемый фермент превосходит все остальные. Такая высокая термостабильность, несомненно, связана с определенными структурными особенностями фермента.

Информация о некоторых особенностях структурной организации молекулы аминопептидазы была получена при исследовании влияния ингибиторов различных групп на каталитическую активность фермента. Оказалось, что дитиотрейтол (ДТТ) — реагент, восстанавливающий дисульфидную связь, угнетает активность фермента полностью при концентрации 10^{-4} М (рис. 5, а), а парахлормеркурийбензоат (ПХМБ) при этой же концентрации повышает ее в 4,5 раза (рис. 5, б). На основании результатов измерения начальной скорости гидролиза субстрата аминопептидазой *B. licheniformis* в присутствии ДТТ в различных концентрациях была рассчитана константа ингибирования, составляющая 6×10^{-6} М. Порядок этой величины позволяет сделать вывод о ре-

шающем значении дисульфидных связей в создании нативной конфигурации молекулы исследуемого фермента. К настоящему времени не описаны аминопептидазы бацилл, содержащие дисульфидные связи. Установленный ранее факт снижения активности аминопептидазы *Aspergillus oryzae* довольно высокими концентрациями (4×10^{-3} М) редуцирующих веществ (цистеина, β -меркаптоэтанола) авторы [4] объясняют тем, что реагенты связывают металл в активном центре. Наблюдаемое нами действие ДТТ на исследуемый фермент, очевидно, носит другой характер и указывает на специфическое воздействие ингибитора на дисульфидную связь. Наличие одной или нескольких ди-

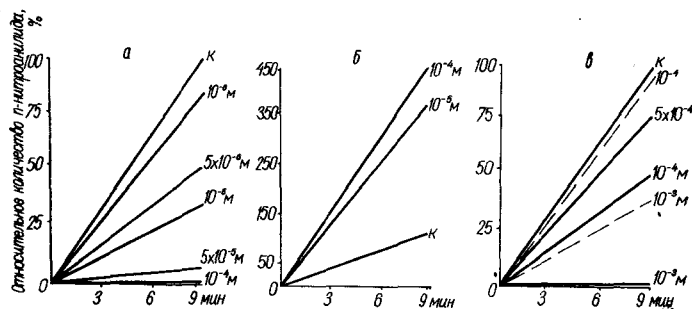


Рис. 5. Влияние эффекторов на активность аминопептидазы: а — ДТТ; б — ПХМБ; в — о-фенантролин (сплошная линия) и ЭДТА (пунктир). К — активность аминопептидазы без эффектора.

сульфидных связей в молекуле аминопептидазы термофильной бактерии *B. licheniformis* делает ее очень прочной структурой, для нарушения которой требуются значительные энергетические затраты. Вероятно, именно эта особенность и определяет высокую термостабильность исследуемого фермента. Можно предположить, что это свойство возникло в эволюционном процессе вида и связано с физиологическими особенностями штамма, вегетирующего при температуре до 54°C .

Активность очищенной аминопептидазы, так же, как и частично очищенной, существенно угнеталась хелаторами двухвалентных металлов, однако эффективность металлосвязывающих агентов как ингибиторов исследуемого фермента на 2—3 порядка ниже, чем эффективность ДТТ (рис. 5, в). K_i для о-фенантролина составляет 10^{-4} М, для ЭДТА — 8×10^{-4} М.

В оптимальных условиях (рН 8,3; температура 80°C ; присутствие CO_2 , 10^{-4} М) аминопептидаза *B. licheniformis* гидролизовала синтетический трипептид лейцил-глицил-глицин и хромогенный субстрат Leu-pNA в соответствии с кинетикой Михаэлиса — Ментен. Исходя из графика зависимости двойных обратных величин для последнего субстрата были рассчитаны значения K_M (1,25 мМ) и V_{max} (74,5 Ед). Аминопептидаза также гидролизовала п-нитроанилиды лизина, аргинина и глутаминовой кислоты со скоростью, составляющей от скорости гидролиза Leu-pNA соответственно 70,6; 37,4 и 12,9 %. п-Нитроанилиды аланина и пролина ферментом не расщеплялись. Фермент гидролизовал лейцинамид, хотя и с небольшой скоростью.

Несмотря на то, что был испытан далеко не полный набор анилидов аминокислот, можно заключить, что специфичность исследуемого фермента аналогична специфичности ранее описанной аминопептидазы мезофильного штамма *B. licheniformis* [13], однако каталитическая активность первого на порядок выше.

Итак, из культуральной жидкости термофильного штамма *B. licheniformis* выделена и очищена новая аминопептидаза, отличающаяся особенностями структурной организации, высокой каталитической активностью и чрезвычайной термостабильностью от описанных ранее аминопептидаз этого же вида микроорганизмов [8, 13], а также от термостабильных аминопептидаз других бацилл [10, 11, 14, 15, 16].

AMINOPEPTIDASE OF THE THERMOPHILIC STRAIN
OF *BACILLUS LICHENIFORMIS*

I. N. Pavlova, T. V. Rotanova, L. G. Zholner

Summary

Amino-peptidase is isolated and purified from the culture liquid of the thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. The amino-peptidase predominantly splits off N-terminal leucin in short peptides and hydrolyzes leucinamide as well. The molecular weight of the enzyme is about 60 kDa. The enzyme is able to form aggregates.

Optimum of amino-peptidase activity was demonstrated at pH 8.0-8.3 and temperature of 85°C. The enzyme is inactivated by metal-binding reagents and reducing substances, and is activated by cobalt and PCMB ions. The EDTA-inactivated enzyme activity is reduced by cobalt and zinc ions, however the latter has no activating action.

The enzyme under study is characterized by high thermostability: in the presence of the substrate at the temperature of 90°C the reaction linearity is retained for not less than 2 h and without the substrate the half-life of the amino-peptidase at 90°C is 145 min.

Extracellular amino-peptidase of the thermophilic strain of *B. licheniformis* is a new enzyme differing from the amino-peptidases described by the present in high thermostability, induced, evidently, by the presence of one or several disulphide bonds in the enzyme molecule.

1. Ваганова Т. И., Иванова Н. М., Клепикова Ф. С. и др. Выделение и свойства аминоклепептидазы из *Bacillus thuringiensis* // Биохимия.— 1984.— 49, № 11.— С. 1899—1907.
2. Диксон М., Узбб Э. Ферменты.— М.: Мир, 1982.— 392 с.
3. Жолнер Л. Г., Павлова И. Н., Тиньянова Н. З. Протеазы и их роль в литической активности термофильного штамма *Bacillus* sp. 86 // Микробиол. журн.— 1988.— 50, № 1.— С. 20—25.
4. Иванова Н. М., Ваганова Т. И., Стронгин А. Я., Степанов В. М. Выделение и свойства лейциламинопептидазы из *Aspergillus oryzae* // Биохимия.— 1977.— 42, № 5.— С. 843—849.
5. Павлова И. Н., Жолнер Л. Г., Захарова И. Я. и др. Сериновая протеиназа с литическими свойствами // Микробиология.— 1988.— 57, № 3.— С. 398—404.
6. Петрова И. С., Винцоняйте М. М. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробиологического происхождения // Прикл. биохимия и микробиология.— 1966.— 2, № 3.— С. 322—327.
7. Andrews P. The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weight over a wide range // Biochem. J.— 1965.— 96, N 4.— P. 595—606.
8. Hall F. F., Kunkel H. O., Prescott J. M. Multiple proteolytic enzymes of *Bacillus licheniformis* // Arch. Biochem. and Biophys.— 1966.— 114, N 1.— P. 145—153.
9. Matheson T. A modified Yemm and Cocking ninyhydrin reagent for peptidase assay // Can. J. Biochem.— 1964.— 42, N 1.— P. 95—103.
10. Matsumura Y., Minamiura N., Fukumoto J., Yamamoto T. Intracellular peptidases of *Bacillus subtilis* // Agr. Biol. Chem.— 1971.— 35, N 5.— P. 975—982.
11. Myrin P. A., Hofsten B. V. Purification and metal activation of an amino-peptidase from *Bacillus stearothermophilus* // Biochim. et biophys. acta.— 1974.— 350, N 1.— P. 13—25.
12. Ray L. E., Wagner F. W. Characteristics of an amino-peptidase activity from the cultural fluid of *Bacillus subtilis* // Can. J. Microbiol.— 1972.— 18, N 6.— P. 853—859.
13. Rodriguez-Absi J., Prescott J. M. Isolation and properties of an amino-peptidase from *Bacillus licheniformis* // Arch. Biochem. and Biophys.— 1978.— 186, N 2.— P. 383—391.
14. Roncari G., Zuber H. Thermophilic amino-peptidases from *Bacillus stearothermophilus* // Int. J. Protein Res.— 1969.— 1, N 1.— P. 45—61.
15. Stoll E., Weder H., Zuber H. Amino-peptidase II from *Bacillus stearothermophilus* // Biochim. et biophys. acta.— 1976.— 438, N 1.— P. 212—220.
16. Stoll E., Hermodson M. A., Ericsson L. H., Zuber H. Subunit structure of the thermophilic amino-peptidase I from *Bacillus stearothermophilus* // Biochemistry.— 1972.— 11, N 25.— P. 4731—4735.
17. Wagner F. W., Chung L. E., Ray L. E. Characteristics of an amino-peptidase from *Bacillus subtilis* as an extracellular enzyme // Can. J. Microbiol.— 1972.— 18, N 10.— P. 1883—1891.

Получено 22.11.88