

УДК 577.15.07.543.544

ОЧИСТКА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ ИЗ *Bacillus subtilis* СКБ 256 БИОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

© 2011 г. У. Р. Раджабов, К. Д. Давранов, М. М. Рахимов

Национальный университет Узбекистана им. М. Улугбека, Ташкент, 100095

e-mail: k_davranov@mail.ru

Поступила в редакцию 20.12.2009 г.

Разработан простой и эффективный метод очистки внеклеточных протеиназ из *Bacillus subtilis* В-1 (СКБ 256) до высокоочищенного состояния. Для этого синтезирован сорбент, представляющий собой сорсилен, пропитанный гемоглобином или цитохромом *c*. Выявлена существенная разница при использовании в качестве биоспецифического лиганда гемоглобина и цитохрома *c*. Выход фермента составил около 40.6 и 65.6% от адсорбированного на носителях фермента, соответственно. Показано, что протеиназы из этой культуры представлены двумя формами, которые различаются молекулярными массами, т.к. разделяются при гель-фильтрации на сефадексе G-50, но эти формы в денатурированном состоянии в 12.5%-ном ПААГе в присутствии 0.1% ДДС-На проявляются в виде одной полосы с ММ 27 кДа. Изучено влияние pH среды, ионной силы и этанола на сорбцию и десорбцию протеиназ на биоспецифическом сорбенте. Показано положительное влияние 20%-ного этанола на процесс десорбции протеиназ.

В настоящее время разработаны различные способы выделения и очистки протеиназ, включая методы биоспецифической хроматографии [1–5]. В качестве лигандов для биоспецифической хроматографии успешно используется как низкомолекулярные, так и высокомолекулярные соединения, имеющие сродство к протеиназам [1–3]. Например, в качестве полимерных биоспецифических лигандов были использованы синтетический полилизин, грамицидин, белки — гемоглобин и овомукоид, нативная белковая часть деминерализованного хитина, иммобилизованные на различных носителях. Такие сорбенты оказались достаточно эффективными для аффинной хроматографии протеолитических ферментов из ряда источников [4–6]. Вместе с тем в большинстве случаев методы биоспецифической хроматографии на сорбентах с ковалентно связанными лигандами являются многостадийными, особенно при синтезе самих сорбентов с теми или иными лигандными группами, и характеризуются невысоким выходом очищенных ферментов.

Цель работы — изучение эффективности насыщенного гемоглобином и цитохромом *c* сорсилена для биоспецифической очистки протеиназ, секретруемых *Bacillus subtilis* СКБ 256.

МЕТОДИКА

Фермент получали из фильтрата культуральной жидкости *B. subtilis* СКБ 256. Штамм выделен сотрудниками кафедры микробиологии и биотехнологии Национального университета Узбекистана и хранится в музее кафедры, а также депонирован и хранится в музее типовых культур Института мик-

робиологии АН РУз под номером СКБ 256. Условия выращивания, состав питательной среды не отличались от ранее описанных [7]. Прирост биомассы измеряли нефелометрически при 590 нм. Продуктивность культуры определяли как отношение величины протеолитической активности в культуральной жидкости к величине биомассы и выражали в условных единицах.

Культуральную жидкость отделяли от клеток центрифугированием в течение 30 мин при 6000 g (4°C). Активность протеиназы измеряли по модифицированному методу [8] в 0.1 М универсальном буфере, pH 8.0, используя хромогенный субстрат *p*-нитроанилид бензилоксикарбонил-L-аланил-L-аланил-L-лейцин (Z-Ala-Ala-Leu-pNA), синтезированный по методу [9], а в качестве фермента — 1 мл раствора протеиназы из *B. subtilis* СКБ 256, содержащего 0.02–0.03 ед. активности.

Биоспецифический сорбент для очистки протеиназ получали путем пропитывания сорсилена гемоглобином (“Reanal”, Венгрия) или цитохромом *c* (“Biomed”, Польша). Для создания эффективного сорбента в качестве лиганда были использованы белки с разными молекулярными массами и другими физико-химическими свойствами, а в качестве носителя — сорсилен (продукт Высшей технологической школы г. Праги, Чехия) с различным размером пор, способный связываться с белками с различными физико-химическими свойствами. Пропитывание носителя осуществляли следующим образом: 1 г сорсилена суспендировали в пятикратном объеме 1%-ного раствора гемоглобина или цитохрома *c* в 0.05 М универсальном буфере, pH 8.0.

Смесь перемешивали и выдерживали в течение 10–12 ч при 6–10°C. Осадок промывали тем же буфером, содержащим 20% этанола, до исчезновения следов белка в промывной жидкости (тест – определение оптической плотности при 280 и 260 нм). Содержание белков лигандов зависит от конкретных условий эксперимента и составляет от 0.05 до 1.0 мг/г носителя. Синтезированный сорбент проявляет специфичность к протеиназам, он стабилен в пределах pH от 4.5 до 9.5. Сорбционная емкость сорбента зависит от условий биоспецифической сорбции фермента и при подобранных условиях (pH 7.0–8.0, температура 26–28°C, ионная сила буфера 0.1 М) составляет в среднем 2.8–3.2 ед./г для гемоглобин–сорсилена и 1.6–1.8 ед./г для цитохром *c*–сорсилена. Наилучшие результаты по очистке внеклеточных протеиназ были получены в экспериментах с носителем, содержащим 1 мг гемоглобина и 0.7 мг цитохрома *c* на 1 г сорбента. После промывания сорбента буфером, содержащим 20% этанола, к нему добавляли раствор препарата протеиназы с концентрацией 3 мг/мл по белку, приготовленный в 0.05 М буфере, pH 8.0, содержащем 20% этанола, перемешивали и выдерживали в течение 15–20 мин при 6–10°C. Затем сорбент трижды промывали пятикратным количеством 20%-ного раствора этанола и отделяли центрифугированием (6000 g, 10 мин). Связанную протеиназу десорбировали с носителя, используя 1 М NaCl, содержащий 20% этанола. Элюированную с сорбента фракцию далее подвергали гель-фильтрации через колонку (1.4 × 30 см) с сефадексом G-50. На колонку наносили 4.0 мг протеиназы с общей активностью 6.8–7.2 ед. В элюатах определяли содержание белка по Лоури, а также спектрофотометрически, считая что концентрация белка 1 мг/мл соответствует $A_{280} = 1$ в кювете толщиной 1 см.

Степень чистоты и молекулярную массу (ММ) ферментов определяли электрофоретически в 12.5%-ном ПААГ в присутствии 0.1% ДДС-Na с использованием белковых маркеров фирмы “Sigma” (США): БСА (66 кДа), овальбумин (45 кДа), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (36 кДа), карбонангидраза (29 кДа), химоотрипсиноген (24 кДа), ингибитор трипсина из сои (20.1 кДа), лактальбумин (14.2 кДа).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что *B. subtilis* СКБ 256 секретирует в культуральную жидкость две формы протеиназы. По характеру гидролиза специфического хромогенного субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNA они были отнесены к субтилизиноподобным протеиназам [7]. Формы протеиназ различаются и по pH-оптимуму. Одна, более подвижная форма (R_f 0.32), проявляет максимальную активность при pH 8.5, тогда как другая – менее подвижная форма (R_f 0.16), – при pH 8.0. Максимальная протеиназная активность культуральной жидкости равна 0.03 ед./мл.

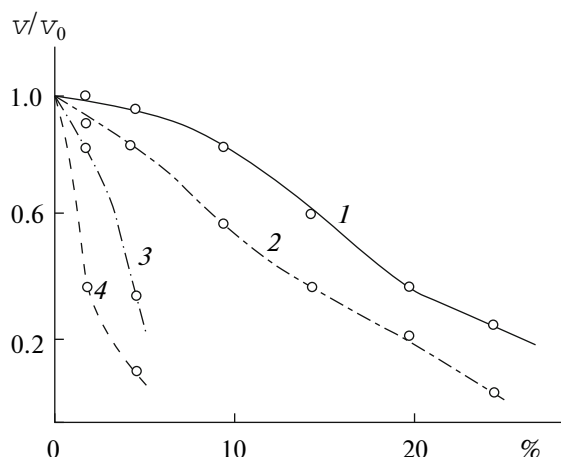


Рис. 1. Влияние первичных спиртов на активность протеиназы из *B. subtilis* СКБ 256: 1 – метанол, 2 – этанол, 3 – н-пропанол, 4 – н-бутанол, v_0 – скорость гидролиза гемоглобина в отсутствие спирта, v – то же в присутствии различных количеств спирта (%).

Известно, что протеиназы имеют достаточно высокое сродство к белковым субстратам типа гемоглобина или цитохрома *c*. Прочность связывания с ними значительно выше, чем с другими субстратами или синтетическими пептидами (хотя каталитическая реакция может протекать медленнее). Поэтому мы предположили, что на основе этих субстратов можно попытаться создать биоспецифические сорбенты, используя пористые носители, пропитанные этими белками.

После предварительного испытания ряда сорбентов (полиамиды, базальтовые волокна, неорганические полимеры, фильтрующие материалы типа Millirog (“LKB”, Швеция) и др.) был выбран синтетический сорбент-сорсилен, представляющий собой сополимер терефталевой кислоты и этиленгликоля. Коммерческий сорсилен имеет объем пор 2–3 см³/г и удельную поверхность 50–120 м²/г полимера. Комплексы с белками стабильны при широком значении pH: от 3.0 до 8.5 в 2 М растворах нейтральных солей [10].

Предварительными исследованиями установлено, что адсорбированный на сорсилене гемоглобин и цитохром *c* при инкубации в растворах, содержащих протеиназы, подвергаются ферментативному гидролизу. Было также установлено, что этанол замедляет этот процесс, а при его концентрации в среде свыше 20% ферментативный процесс практически не протекает, хотя присутствие спирта мало влияет на связывание фермента с гемоглобином или цитохромом *c*.

Результаты экспериментов, полученные при ингибировании протеиназ из *B. subtilis* СКБ 256 одноатомными спиртами, показали, что их удельная активность снижалась в присутствии этанола, в зависимости от концентрации последнего (рис. 1, кривая 2).

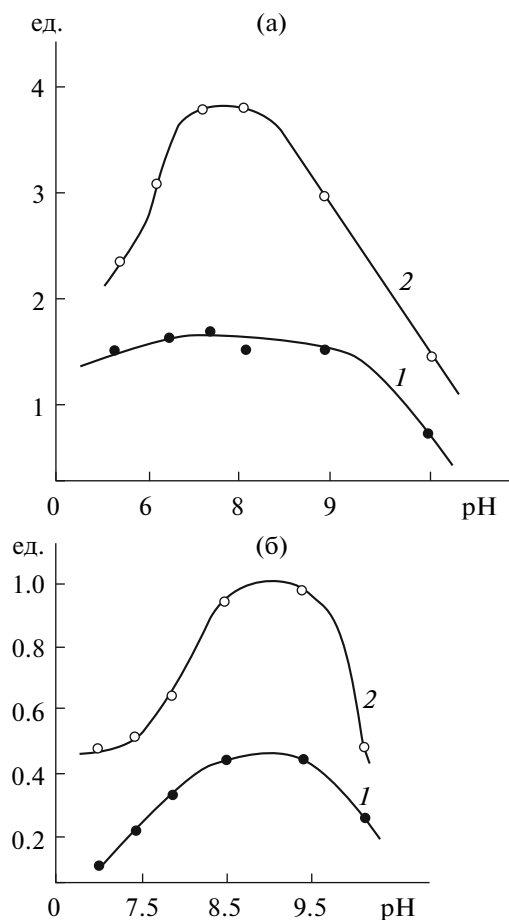


Рис. 2. Влияние pH среды на адсорбцию (а) и десорбцию протеиназы (ед.) *B. subtilis* СКБ 256 из биоспецифического сорбента под действием 1 М NaCl (б); 1 – сорсилен, пропитанный гемоглобином, 2 – сорсилен, пропитанный цитохромом с.

Протеиназная активность подавляется и в присутствии других спиртов, с увеличением длины цепи углеводородной части исследуемых спиртов (т.е. с увеличением гидрофобности) их ингибирующий эффект усиливается (рис. 1, кривая 3, 4). Снижение удельной активности протеиназы при действии метанола в концентрации до 5–6 % незначительно (рис. 1, кривая 1). Вследствие этого с целью ингибирования гидролиза субстрата в условиях хроматографии все эксперименты по подбору условий адсорбции и десорбции фермента проводили в водно-спиртовой среде.

Существенное влияние на связывание протеиназы из *Bacillus subtilis* СКБ 256 с биоспецифическим сорбентом в водно-спиртовой среде оказывает величина pH (рис. 2).

Степень связывания протеиназы с белковыми субстратами после пропитывания ими сорсилена максимальна при значениях pH от 7.0 до 8.0 (рис. 2а). В этих условиях в 1 г сорсилена, пропитанном гемоглобином, связывается 2.8–3.2 ед. актив-

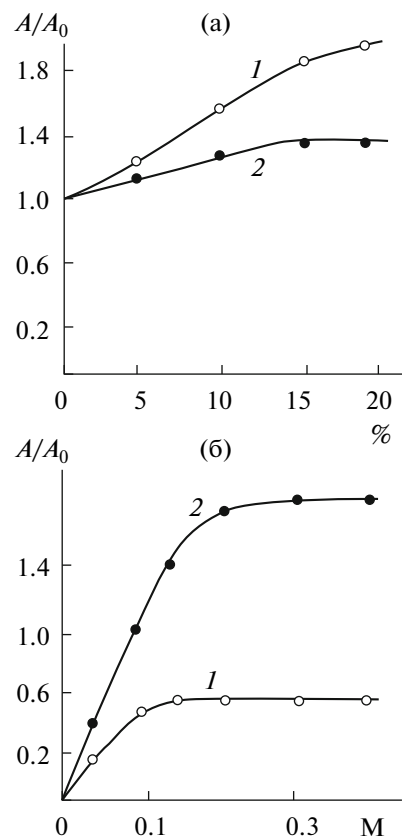


Рис. 3. Влияние состава элюирующего раствора на десорбцию протеиназы из *B. subtilis* СКБ 256: а – этанол (%) в 0.1 М растворе NaCl; б – хлористый натрий (М) в 20%-ном этаноле; 1 – сорсилен–гемоглобин, 2 – сорсилен–цитохром с. A/A_0 – активность фермента, десорбированного в присутствии и без этанола (A_0).

ности фермента, а в 1 г носителя, пропитанном цитохромом с – 1.6–1.8 ед. активности. При элюции сорбированного фермента 1 М NaCl было показано, что значительное количество фермента может быть десорбировано при значении pH среды 8.5–9.0 (рис. 2б). Выход фермента для сорбентов с цитохромом с в этих условиях составил 35% от общей активности нанесенного фермента, тогда как для сорбентов с гемоглобином эта цифра составила 38%.

Исследовали влияние концентрации хлористого натрия и этанола в составе элюирующего агента на процесс десорбции протеиназы из *Bacillus subtilis* СКБ 256 с биоспецифического сорбента (рис. 3).

Десорбция протеиназы может протекать при элюции раствором 0.1 М NaCl, содержащего различные концентрации этанола (рис. 3). При этом с сорсилен–цитохрома с десорбируется $A_0 = 0.65$ ед. акт. фермента (рис. 3а, кривая 2), а с сорсилен–гемоглобина $A_0 = 1.05$ ед. акт. фермента (рис. 3а, кривая 1). Как видно из кривых рис. 3а, присутствие в составе элюирующего агента 20% этанола увеличивает де-

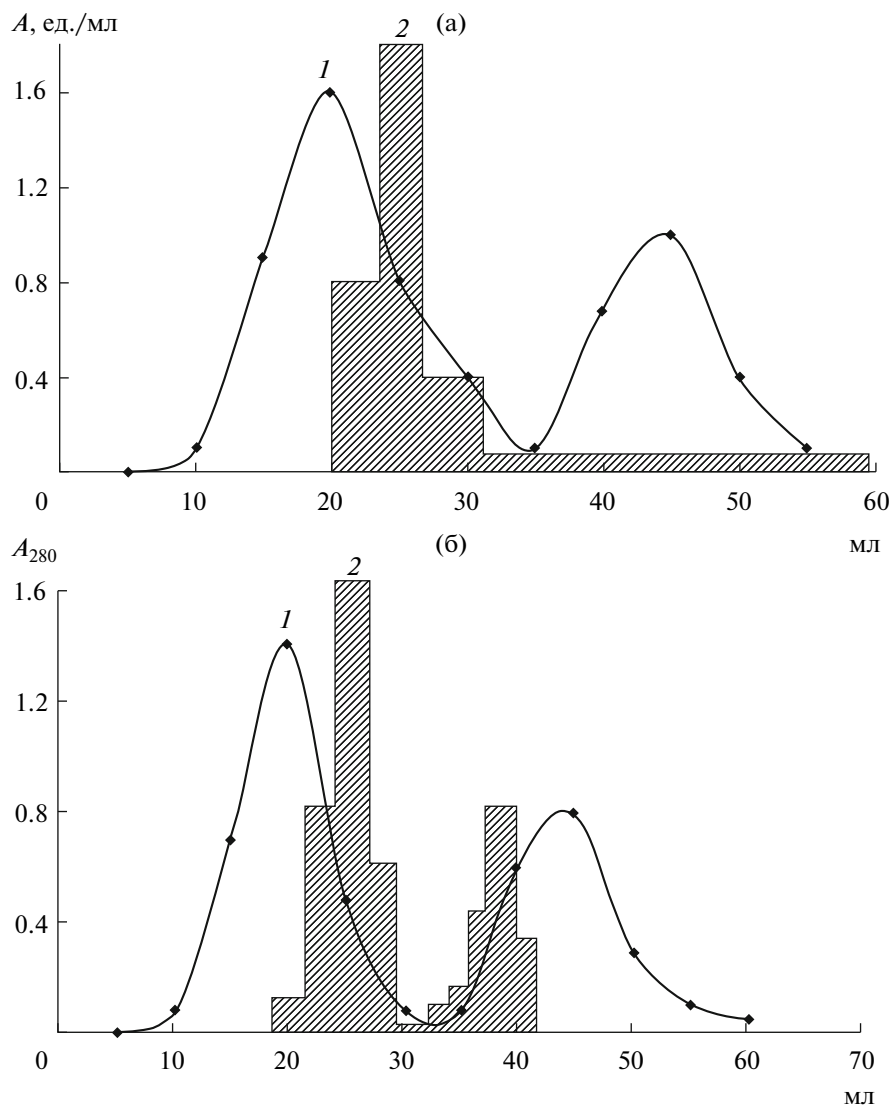


Рис. 4. Гель-фильтрация на сефадексе G-50 фракций (мл), элюированных с биоспецифического сорбента водным (а) и водно-спиртовым (б) растворами: 1 – белок, 2 – активность протеиназы из *B. subtilis* СКБ 256.

сорбцию фермента с сорсилен–гемоглобина в 1.8 раза, а с сорсилен–цитохрома *c* – в 1.2 раза.

Значительное влияние на десорбцию фермента оказывает также величина ионной силы раствора. Из данных рис. 3б видно, что промывание сорбента 20%-ным раствором этилового спирта без NaCl не приводило к десорбции протеиназы, хотя при этом с сорбента удалялось более 70% балластных белков. Увеличение ионной силы способствует десорбции протеиназы при концентрации NaCl 0.2–0.3 М; кривая десорбции выходит на плато как в системе сорсилен–гемоглобина, так и сорсилен–цитохрома *c*. Существенное повышение выхода по активности характерно для сорбента сорсилен–гемоглобин. Для этого сорбента лучшим элюентом является 20%-ный спиртовой раствор, содержащий 0.4 М NaCl, а для сорси-

лен–цитохрома *c* – 20%-ный спиртовой раствор, содержащий 0.15 М NaCl.

Протеиназа из *B. subtilis* СКБ 256, полученная после биоспецифической обработки, достаточно чиста, но негомогенна (рис. 4), т. к. она элюируется двумя пиками при гель-фильтрации на сефадексе G-50. Эти данные подтверждают, что *B. subtilis* СКБ 256 синтезирует молекулярные формы протеиназ, различающиеся между собой по молекулярной массе, но имеющие одинаковое сродство к биоспецифическому сорбенту. Видно (рис. 3), что проведение десорбции в присутствии 20% этанола положительно сказывается на чистоте фермента. Количество примесей, которые обнаруживаются в элюате, значительно ниже, когда очистка происходит в присутствии этанола (рис. 4б).

Показано, что протеиназы из этого штамма представлены двумя формами, которые в нативном состоянии различаются своими молекулярными массами, т. к. разделяются при гель-фильтрации на сефадексе G-50 (рис. 4). Степень чистоты полученных белков и их молекулярную массу определяли с помощью электрофореза в 12.5%-ном ПААГ в денатурирующих условиях, который показал для каждой из белковых фракций наличие одного полипептида с молекулярной массой около 27 кДа. Разделение этих фракций при гель-фильтрации, по-видимому, связано с содержанием небелковой части во фракции фермента с большей молекулярной массой. Следует отметить, что молекулярные массы субтилизиноподобных протеиназ, выделенных из различных штаммов, спорообразующих бактерий рода *Bacillus*, варьируют в пределах 27–32 кДа [1]. Классические субтилизины ВРН и Карлсберг имеют молекулярные массы 27.5 и 27.3 кДа соответственно [1]. Молекулярная масса субтилизиноподобных протеиназ, секретируемых в стационарной фазе роста *B. amyloliquefaciens* H2, равна 29 кДа. Для субтилизиноподобных протеиназ, *Bacillus intermedius* в ранней и поздней стационарных фазах роста показано, что их молекулярные массы составляют 32.5 и 28 кДа соответственно, однако имеют одинаковую молекулярную массу в денатурирующих условиях 27 кДа. Протеиназная активность обоих форм фермента чувствительна к этанолу и другим спиртам.

Изучено влияние рН среды, ионной силы и этанола на сорбцию протеиназ на биоспецифическом

сорбенте и десорбцию из него. Показано положительное влияние 20%-ного этанола на процесс десорбции протеиназ.

Таким образом, полученные результаты показывают, что биоспецифические сорбенты, синтезированные путем пропитывания сорсилена белками, могут быть использованы для очистки протеиназы из *B. subtilis* СКБ 256.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Siezen R.J., Leunissen J.A.M. // Prot. Sci. 1997. V. 6. P. 501–523.
2. Ballinnger M.D., Wells J.A. // Handbook of Proteolytic Enzymes. N.Y.: Acad. Press. 1998. P. 284–294.
3. Rawlings N.D., Barrett A.J. // Biochem. J. 1993. V. 290. P. 205.
4. Rawlings N.D., Barrett A.J. // Method Enzymol. 1994. V. 244. P. 19.
5. Barrett A.J., Rawlings N.D. // Arch. Biochem. Biophys. 1995. V. 318. P. 247.
6. Котлова Е.К., Иванова Н.М., Юсупова М.П., Воюшина Т.Л., Иванушкина Н.Е., Честухина Г.Г. // Биохимия. 2007. Т. 72. № 1. С. 137–144.
7. Ражабов. У.Р. // Докл. АН Узбекистана. 2009. № 5. С. 83–85.
8. Балабан Н.П., Михайлова Е.О., Марданова А.М., Руденская Г.Н., Шарипова М.Р. // Биохимия. 2007. Т. 72. № 4. С. 568–575.
9. Houmard J. // Eur. J. Biochem. 1967. V. 68. P. 621–628.
10. Budin J., Kubanek V. // Chem. Prum. 1978. V. 28. P. 589.

Purification of Extracellular Proteinases from *B. subtilis* SKB 256 by Biospecific Chromatography

U. R. Radzhabov, K. D. Davranov, and M. M. Rakhimov

Ulugbek National University of Uzbekistan, Tashkent, 100095 Uzbekistan

e-mail: k_davranov@mail.ru

Received December 12, 2009

Abstract—A simple and efficient method of preparing highly purified extracellular proteinases of *B. subtilis* B-1 (SKB 256) has been developed. A sorbent based on sorsilen impregnated with hemoglobin or cytochrome *c* has been synthesized for this purpose. A significant difference between the efficiency of hemoglobin and cytochrome *c* as biospecific ligands has been observed: the enzyme yield amounted to 40.6 and 65.6% of the total amount of enzyme adsorbed, respectively. The culture was shown to contain two major proteinase forms with different molecular masses that could be separated by chromatography on a Sephadex G-50 but gave only one band with MW 27 kDa upon denaturing electrophoresis in 12.5% PAG in the presence of 0.1% SDS. The influence of eluent pH, ionic strength and ethanol concentration on the sorption of the proteinases on the biospecific sorbent, as well as on the desorption from it, has been investigated. Positive influence of 20% ethanol on proteinase desorption has been demonstrated.