

УДК 577.151

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА Mn-ПЕРОКСИДАЗЫ *Azospirillum brasilense* Sp245

© 2012 г. М. А. Купряшина, Н. Ю. Селиванов, В. Е. Никитина

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, 410049

e-mail: Kupryashina_m@mail.ru

Поступила в редакцию 14.02.2011 г.

Из культуральной жидкости *Azospirillum brasilense* Sp245, выращенной на среде с 0.1 мМ пирокатехином, выделена гомогенная Mn-пероксидаза со степенью очистки в 26 раз. По данным электрофореза в ПААГ с Na-ДДС молекулярная масса фермента ~43 кДа. Показано, что использование пирокатехина и 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) в концентрациях 0.1 и 1.0 мМ в качестве индукторов увеличивало активность Mn-пероксидазы в 3 раза.

Дiazотрофные бактерии рода *Azospirillum*, способные к синтезу биологически активных веществ, положительно влияющие на рост и развитие растений, являются модельными объектами в исследовании растительно-бактериальной ассоциации. Относительно недавно появились сведения о наличии у бактерий этого рода фенолоксидазной активности [1–3]. В.Е. Никитиной с соавт. [3] в результате скрининга различных штаммов бактерий рода *Azospirillum* на наличие фенолоксидаз обнаружена активность Mn-пероксидазы.

Впервые [4] Mn-пероксидаза (MnП, КФ 1.11.1.13) была выделена из *Phanerochaete chrysosporium*, фермент обладал окислительной активностью только в присутствии Mn^{2+} . Позднее было показано, что фермент катализирует пероксидазависимое окисление Mn^{2+} до Mn^{3+} , который, в свою очередь, является сильным окислителем. Как правило, MnП внеклеточный фермент с молекулярной массой 42–47 кДа [5].

Принимая во внимание высокую окислительную способность MnП, простоту в использовании, фермент часто используется как окислитель природного происхождения в современных биотехнологиях при отбеливании бумажной массы и текстильных материалов, очистки сточных вод и природных водоемов от загрязнений биоцидами, красителями, различными ксенобиотиками. Выделены и относительно хорошо изучены MnП нескольких видов базидиомицетов, однако бактериальные MnП практически не изучены. На сегодняшний день существует лишь одна работа, посвященная выделению и очистке бактериальной MnП из *Vacillus pumilus* и *Paenibacillus* sp. [6]. Высокая окислительная способность MnП, а также разнообразие физиологических функций выполняемых у различных организмов, делает этот фермент привлекательным для фундаментальных и прикладных исследований.

Цель работы – выделение и очистка внеклеточной MnП *Azospirillum brasilense* Sp245.

МЕТОДИКА

Бактерии и условия культивирования. В качестве объекта исследования использовали штамм *A. brasilense* Sp245 из коллекции микроорганизмов ИБФРМ РАН. Культивирование бактерий проводили в колбах Эрленмейера (250 мл) на жидкой среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 0.1; K_2HPO_4 – 0.4; NaCl – 0.1; $Na_2MoO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.002, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.2; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.02; яблочная кислота – 5.0; NaOH – 1.7; NH_4Cl – 1.0; $CaCl_2$ – 0.02; 1мМ $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, pH – 6.8. Посевным материалом служила 12-часовая культура, выращенная на среде того же состава. Бактерии культивировали в течение 36 ч в термостате при температуре 37°C.

Индукция MnП-активности. В качестве индукторов MnП в среду при засеве культуры вносили синрингалдазин (“Acros Organics”, США), 2,6-диметоксифенол (“Acros Organics”), 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) (АБТС; “Sigma”, США) и пирокатехин (“Acros Organics”) в концентрациях 0.1, 0.5 и 1 мМ. Пробы для определения ферментативной активности отбирали через 24 и 36 ч в экспоненциальную и стационарную фазу роста культуры соответственно.

Определение Mn-пероксидазной активности. На всех этапах исследования активность внеклеточной MnП определяли спектрофотометрически на приборе Specord M 40 (“Carl Zeiss”, Германия) по скорости окисления 2,6-диметоксифенола ($\epsilon = 30.5 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) при 30°C [7]. Реакционная смесь объемом 2 мл содержала: 50 мМ Na-тарtratный буфер, pH 4.5, 1 мМ 2,6-диметоксифенол, 1 мМ $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, препарат фермента. Реакцию начинали добавлением 100 мкл 1 мМ H_2O_2 . За 1 единицу активности фермента принимали из-

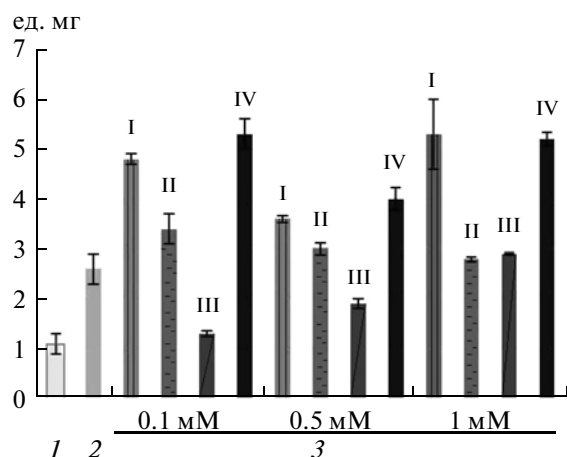


Рис. 1. Активность МнП в культуральной жидкости *A. brasilense* Sp245: 1 – среда без индукторов; 2 – среда с 1.0 мМ $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 3 – среды с фенольными индукторами: I – пирокатехин, II – сирингалдазин, III – 2,6-диметоксифенол, IV – АБТС.

менение поглощения при 468 нм на 1 единицу за 1 мин. Удельную активность выражали в ед. на 1 мг белка. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд.

Очистка фермента. Через 36 ч роста бактерий культуральную жидкость, содержащую в качестве индуктора 0.1 мМ пирокатехин, центрифугировали 20 мин при 4°C и 10000 g. Супернатант обессоливали на колонке с сефадексом G-25 против буфера А (0.025 М Na-ацетатный буфер, pH 5.0). Выход белковых фракций регистрировали на приборе Uvicord S-II (“ЛКВ”, Швеция) при $\lambda = 280$ нм. Собранные активные фракции очищали с помощью HPLC SmartLine 5000 (“Knauer”, Германия). Разделение проводили на анионообменной колонке TSK Bioassist Q (“Tosohaas”, США), уравновешенной буфером А. Элюцию проводили градиентом NaCl в буфере А при скорости потока 1 мл/мин с использованием фотометрической детекции при $\lambda = 280$ нм. Фракции, обладающие Мн-пероксидазной активностью, диализовали против воды и использовали для дальнейшего анализа.

Электрофорез. Гомогенность полученного препарата фермента и его молекулярную массу определяли методом электрофореза в денатурирующих условиях (ДДС-Na-ПААГ-электрофорез) по Лемли, используя для этой цели белки-маркеры фирмы “Fermentas” (Латвия): β -галактозидаза (116 кДа), бычий сывороточный альбумин (66.2 кДа), яичный альбумин (45.0 кДа), лактатдегидрогеназа (35.0 кДа), REase Bsp98I (25.0 кДа), β -лактоглобулин (18.4 кДа), лизоцим (14.4 кДа). Электрофорез в ПААГ в неденатурирующих условиях проводили по той же методике, но без кипячения или добавления Na-ДДС и меркаптоэтано-

ла. Белковые полосы окрашивали раствором серебра.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При выращивании *A. brasilense* Sp245 на стандартной среде с малатом и концентрацией Mn^{2+} 0.094 мг/л без индукторов в культуральной жидкости обнаруживали низкую активность МнП, не превышающую 1.2 ед./мг по окислению 2,6-диметоксифенола. При увеличении концентрации $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в среде до 1 мМ активность МнП достигала 2.6 ед./мг (рис. 1). Приведенные данные характерны для бактерий, находящихся в стационарной фазе роста (36-часовая культура), для 24-часовой культуры характерны более низкие значения активности фермента (данные не представлены). Увеличение концентрации марганца в среде, как ранее было показано, повышало также выход и активность грибной МнП [8].

Синтез внеклеточных ферментов в значительной степени определяется составом среды для культивирования. Как правило, высокое содержание в питательных средах сложных органических соединений приводит к более интенсивному росту бактерий, повышает продукцию внеклеточных ферментов. Однако в отношении изучаемой нами внеклеточной МнП азоспирилл был отмечен противоположный эффект. При внесении дрожжевого экстракта активность фермента резко снижалась, поэтому в дальнейшем он не использовался.

Для увеличения активности МнП, основываясь на предположении, что подобно ферментам грибов [9] МнП бактерий также является индуцибельным ферментом, в среду культивирования вносили ароматические субстраты в разных концентрациях. Было показано, что внесение в среду фенольных соединений, таких, как сирингалдазин, 2,6-диметоксифенол, АБТС и пирокатехин, повышало активность МнП. Данные по влиянию фенольных соединений на активность МнП представлены на рис. 1. Увеличение Мн-пероксидазной активности *A. brasilense* Sp245 при культивировании с индукторами наблюдалось через 36 ч, как и при выращивании бактерий на обычной малатной среде. Наибольшая активность МнП, превышающая контрольные значения в 3 раза, была отмечена при внесении в среду для культивирования пирокатехина и АБТС в концентрациях 0.1 и 1.0 мМ соответственно (рис. 1).

Основываясь на полученных данных, дальнейшее культивирование *A. brasilense* Sp245 для выделения и очистки МнП проводили на среде с 0.1 мМ пирокатехином и 1.0 мМ $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в течение 36 ч.

На первом этапе очистки фермента супернатант освобождали от низкомолекулярных приме-

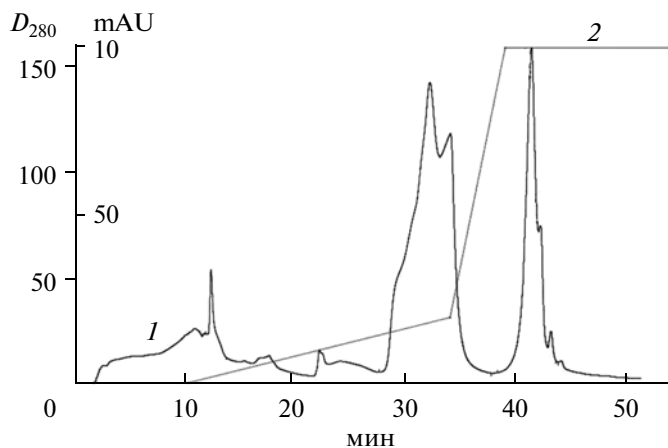


Рис. 2. Хроматография ферментного препарата *A. brasilense* Sp245 на TSK Bioassist Q: 1 – белок, 2 – градиент NaCl.

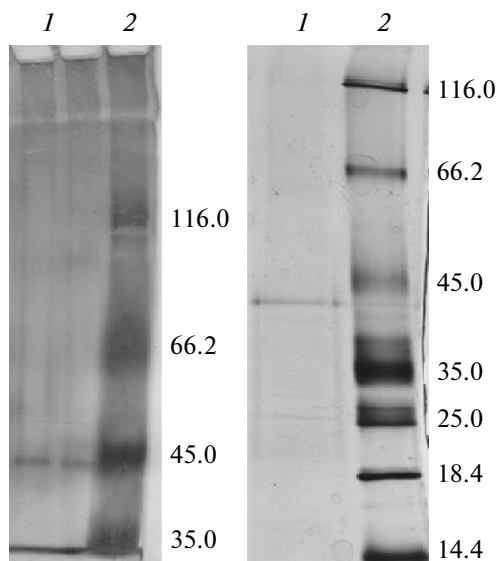


Рис. 3. Электрофорез в ПААГ гомогенной MnП *A. brasilense* Sp245 после очистки на TSK Bioassist Q в неденатурирующих условиях (а) и с Na-ДДС (б): 1 – гомогенный фермент, 2 – маркеры.

сей с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25, уравновешенной 0.025 М Na-ацетатным буфером, рН 5.0. Наибольшую трудность представляло отделение ферментного препарата от пигмента, образующегося в процессе ферментативного окисления индуктора. Полное удаление пигмента происходило только на следующей стадии очистки.

Дальнейшую очистку полученной белковой фракции проводили с использованием ВЭЖХ на препаративной анионообменной колонке TSK Bioassist Q. Проведение хроматографии при низких значениях рН и использование сложного градиента NaCl позволило отделить основную часть балластных белков на этапе нанесения образца на колонку. Белки, обладающие Mn-пероксидазной активностью, прочно связывались с носителем и выходили в зоне высоких концентраций NaCl. Хроматограмма, полученная при очистке препарата MnП на колонке TSK Bioassist Q, представлена на рис. 2. Анализ активности показал, что фермент выходит в виде двух пиков (41 и 42 мин), обладающих примерно одинаковой удельной активностью. Полученные фракции объединяли.

Анализ гомогенности полученного препарата фермента проводили методом электрофореза в неденатурирующих условиях в 7.5%-ном ПААГ (рис.3) и в денатурирующих условиях в присут-

ствии Na-ДДС в 12%-ном ПААГ (рис. 4). Сопоставление данных показало, что внеклеточная MnП *A. brasilense* Sp245 состоит из одной субъединицы с молекулярной массой ~43 кДа.

Удельная активность выделенной бактериальной MnП – 125 ед./мг белка, степень очистки – 26 раз. В таблице представлены результаты по очистке MnП *A. brasilense* Sp245.

Сравнение полученных результатов с данными литературы позволяет констатировать факт, что активность грибных MnП в десятки и сотни раз превышала активность MnП *A. brasilense* Sp245, однако удельная активность выделенного нами фермента оказалась одного порядка с грибными ферментами и даже превышала удельную активность некоторых из них [10].

Сравнении MnП *A. brasilense* Sp245 с выделенными в работе [5] из *Bacillus pumilus* и *Paenibacillus* sp. показало одно существенное отличие. Ферменты, полученные П.Л. Оливера с соавт. [6] проявляли большую активность в щелочной среде, тогда как выделенная нами MnП была активна при низких значениях рН, также, как известные грибные

Результаты очистки внеклеточной MnП *A. brasilense* Sp245

Стадия очистки	Активность, ед.	Содержание белка, мг	Удельная активность, ед./мг	Степень очистки, раз
Культуральная жидкость	4.0	0.84	4.8	1
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	2.3	0.4	5.7	1.2
Ионообменная хроматография на TSK Bioassist Q	0.4	0.0032	125	26

MnП. Безусловно ферменты грибов и бактерий могут иметь различия, однако возможно также, что выделенные ранее из культуральной жидкости *B. pumilus* и *Paenibacillus* sp. ферменты, обладающие столь специфичными свойствами, относятся к другой группе ферментов с пероксидазной активностью.

Как видно из таблицы и рис. 2, 3, анионообменная хроматография на TSK Bioassist Q обеспечивала получение высокоочищенной бактериальной MnП с высокой удельной активностью.

Таким образом, нами впервые выделена гомогенная MnП из бактерий рода *Azospirillum*.

Функциональную роль MnП азоспирилл еще предстоит выяснить. Однако в жизнедеятельности как микроорганизмов, так и растений важную роль во взаимоотношении с окружающей средой играют вторичные метаболиты ароматической природы. В частности, защитные реакции растительных тканей в ответ на механическое повреждение и на атаку микроорганизмов связаны с участием фенольных соединений [11]. Известно, что при формировании растительно-бактериальной ассоциации роль первичных сигналов играют специфические фенольные соединения, в частности флавоноиды, выделяемые корнями в ризосферу и вызывающие хемотаксис у ризобактерий [11]. Основываясь на полученных данных, мы можем предположить, что наличие у *A. brasilense* Sp245 фенолоксиляющего фермента, активность которого коррелирует с концентрацией аромати-

ческих соединений в среде, может быть связана с механизмами адаптации, повышающими выживаемость, конкурентоспособность азоспирилл в ризосфере, благодаря возможности бактерии окислять токсичные фенольные соединения.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ № НШ-3171.2008.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Diamantidis G., Effosse A., Potier P., Bally R.* // Soil Biol. Biochem. 2000. V. 32. P. 919–927.
2. *Faure D., Bouillant M.-L., Bally R.* // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. № 9. P. 3413–3415.
3. *Никитина В.Е., Ветчинкина Е.П., Пономарева Е.Г., Гоголева Ю.В.* // Микробиология. 2010. Т. 79. №3. С. 344–351.
4. *Tien M., Kirk T.* // Science. 1983. V. 221. № 3. P.661–662.
5. *Левит М.Н., Шкроб А.М.* // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 309–345.
6. *Lopes de Oliveira P., Duarte M., Ponezi A., Durrant L.* // Brazilian J. Microbiol. 2009. V. 40. P. 818–826.
7. *Paszczynski A., Crawford R., Huynh V.-B.* // Methods Enzymol. 1988. V. 161. P. 264–270.
8. *Лисов А.В., Леонтьевский А.А., Головлёва Л.А.* // Биохимия. 2003. Т. 68. С. 1256–1265.
9. *Elisashvili V., Kachlishvili E.* // J. Biotechnol. 2009. V. 144. P. 37–42.
10. *Дзедзюля Е.И., Беккер Е.Г.* // Биохимия. 2000. Т. 65. С. 829–835.
11. *Запрометов М.Н.* // Физиология растений 1992. Т. 39. С. 1197–1207.

Isolation and Purification of Mn-Peroxidase from *Azospirillum brasilense* Sp245

M. A. Kupryashina, N. Yu. Selivanov, and V. E. Nikitina

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia
e-mail: Kupryashina_m@mail.ru

Received February 14, 2011

Abstract—Homogenous Mn-peroxidase of a 26-fold purity grade was isolated from a culture of *Azospirillum brasilense* Sp245 cultivated on a medium containing 0.1 mM pyrocatechol. The molecular weight of the enzyme is 43 kD as revealed by electrophoresis in SDS-PAAG. It was shown that the use of pyrocatechol and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonate) at concentrations of 0.1 and 1 mM as inductors increased the Mn-peroxidase activity by a factor of 3.