

УДК 577.15

ВЫДЕЛЕНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПАЗЫ ИЗ ТЕРМОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *Thermosyntropha lipolytica*

© 2012 г. В. М. Гумеров, А. В. Марданов, П. М. Колосов, Н. В. Равин

Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312

e-mail: nravin@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 3.11.2011 г.

В результате расшифровки нуклеотидной последовательности генома термоалкалофильной липолитической бактерии *Thermosyntropha lipolytica* идентифицирован ген, кодирующий липазу, секретируемую в среду. Рекомбинантный фермент экспрессирован в *Escherichia coli*, проведены его выделение и предварительная функциональная характеристика. Липаза проявляла гидролитическую активность в отношении пара-нитрофениловых эфиров с различной длиной цепи, а также триглицеридов, в том числе растительных масел. Оптимальные условия реакции достигались при 70–80°C и pH 8.0. Фермент сохранял более 80% активности в присутствии 10% метанола. Выделенная новая термостабильная липаза может быть перспективным биокатализатором для органического синтеза, применения в пищевой промышленности, производстве моющих средств и получении биодизеля.

Липазы (КФ 3.1.1.3) осуществляют реакции гидролиза и синтеза длинноцепочечных эфиров жирных кислот [1, 2]. Они широко используются в качестве биокатализаторов в различных биотехнологиях, в том числе в пищевой, целлюлозно-бумажной и текстильной промышленности, при проведении тонкого органического синтеза, производстве детергентов, и др. [3, 4]. Перспективным направлением использования липаз является производство биодизеля из растительных масел [5]. Для многих биотехнологических процессов необходимы липазы, устойчивые, в первую очередь, к высоким температурам, а также щелочным и кислым условиям, органическим растворителям и другим экстремальным условиям [6]. Хотя некоторые липазы, выделенные из мезофильных организмов, обладают умеренной термостабильностью, естественным источником таких ферментов являются экстремофильные микроорганизмы, живущие при соответствующих физико-химических условиях.

Thermosyntropha lipolytica — термофильная анаэробная бактерия, выделенная из щелочного озера Богория в Кении [7]. Этот относящийся к порядку Clostridiales микроорганизм растет в широком диапазоне температур от 52 до 70°C при щелочных значениях pH (7.15–9.5). *T. lipolytica* использует органические субстраты, в том числе липиды, гидролиз которых осуществляется секретруемыми в окружающую среду липолитическими ферментами. Особенностью *T. lipolytica* является то, что эта бактерия способна расщеплять триглицериды (например, растительные масла) и утилизировать жирные кислоты в симбиотическом сообществе с метаногенной археей

рода *Methanobacterium* [7]. Ранее из одного штамма *T. lipolytica* были выделены и функционально охарактеризованы две липазы, проявлявшие максимум активности при температуре около 96°C и pH 9.5 [8, 9]. Ферменты были выделены из супернатанта культуры *T. lipolytica* и очищены до гомогенного состояния, однако кодирующие их гены не были идентифицированы [8], что не позволяет получать ферменты в практически значимых количествах.

Цель работы — идентификация генов, кодирующих секретруемые липазы, в результате расшифровки и анализа нуклеотидной последовательности генома *T. lipolytica*, экспрессия в *Escherichia coli*, очистка и характеристика рекомбинантной липазы TSLip1.

МЕТОДИКА

Штаммы микроорганизмов и условия культивирования. Штамм *T. lipolytica* был выделен В.А. Светличным из щелочного озера Богория (Кения) [7]. Культивирование проводили при 60°C в 15 мл пробирках Хангейта на среде следующего состава (г/л): K₂HPO₄ — 0.3, KCl — 0.3, NaCl — 0.5, NH₄Cl — 1.0, MgCl₂ · 6H₂O — 0.3, CaCl₂ · 2H₂O — 0.05, NaHCO₃ — 3.0, Na₂CO₃ — 3.0, Na₂S · 9H₂O — 0.5, NaHCO₃ — 3.0, цистеин — 0.15, дрожжевой экстракт — 10, витамины — 2 мл/л, раствор микроэлементов [10] — 2.5 мл/л. Анаэробно приготовленную среду (pH 8.3, 25°C) разливали под током очищенной от кислорода смеси N₂–CO₂ (80 : 20) порциями по 500 мл и автоклавились при 121°C.

Штамм *E. coli* Rosseta-gami (DE3) (*Dara-leu7697 ΔlacX74 ΔphoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL* (DE3) F'[*lac⁺ (lacI^q) pro*] *gor522::Tn10 trxB pLysSRARE* (Cam^R, Str^R, Tet^R)) использовали для экспрессии рекомбинантной липазы TSLip1. Бактериальные культуры выращивали в условиях аэрации при 37°C в среде или на чашках с LB агаром. В случае необходимости в среду добавляли ампициллин (100 мкг/мл) и хлорамфеникол (20 мкг/мл).

Определение нуклеотидной последовательности генома *T. lipolytica* и идентификация генов, кодирующих липазы. Препарат геномной ДНК *T. lipolytica* выделяли следующим методом. В 1.5 мл микропробирке собирали клетки из 50 мл свежей культуры (~10⁷ кл./мл). Осадок растворяли в 500 мкл ТЕ буфера (10 мМ Трис, рН 8.0, 50 мМ ЭДТА). Клетки лизировали добавлением 10 мкл ДДС-Na (20%-ный водный раствор) и 10 мкл протеиназы К (20 мг/мл). Полученную смесь инкубировали в течение 15 мин при 55°C. Затем вносили 20 мкл 5М NaCl и последовательно экстрагировали равным объемом фенола (рН 8.0), фенол-хлороформа (1 : 1) и хлороформа, перенося каждый раз надосадок в чистые микропробирки. ДНК осаждали изопропанолом.

Для секвенирования генома *T. lipolytica* конструировали библиотеку случайных фрагментов геномной ДНК и проводили ее секвенирование на геномном анализаторе GS FLX ("Roche", Швейцария) с использованием набора реактивов GS XLR70 Sequencing Kit. "Сборку" последовательностей отдельных чтений в объединяющие их протяженные контиги осуществляли с помощью программы GS De Novo Assembler ("Roche", Швейцария). Поиск открытых рамок считывания, способных кодировать белки, осуществляли с помощью программы Genemark [11]. Для предсказания функций белков соответствующие аминокислотные последовательности сравнивали с базой данных NCBI с помощью BLASTP [12]. Наличие сигнальных пептидов в аминокислотных последовательностях белков предсказывали с помощью программы SignalP v. 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) для грамположительных бактерий.

Получение штамма *E. coli* – продуцента рекомбинантной липазы *T. lipolytica*, выделение и очистка фермента. Для ПЦР-амплификации гена липазы TSLip1 без последовательности, кодирующей сигнальный пептид, использовали праймеры: LipF_BamHI (5'-ATGGGGATCCCAAGAAATTC-GAGTAACA-3') и LipR_SalI (5'-AAGGTC-GACTTCTACTCTTCAGCAATAT-3'), в качестве матрицы использовали геномную ДНК *T. lipolytica*. Полученный ПЦР-фрагмент обрабатывали рестриктазами BamHI и SalI и клонировали в экспрессионном векторе pQE80L (Qiagen), позволя-

ющем экспрессировать целевой белок с присоединенными 6 аминокислотными остатками гистидина на N-конце. Рекомбинантный экспрессионный вектор pQE80-Lip вводили в штамм *E. coli* Rosseta-gami (DE3). Полученный штамм выращивали на шейкере при 37°C до достижения D₆₀₀ ~ 0.6, затем индуцировали синтез рекомбинантного белка, внося ИПТГ (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид) до 1 мМ, и продолжали выращивать культуру в течение 20 ч при 37°C. Выделение и очистку рекомбинантной липазы TSLip1 осуществляли методом металл-аффинной хроматографии с помощью набора Spin-NTA KIT ("Qiagen", Германия). Препарат диализовали с помощью колонок Illustra NAP-10 ("GE Healthcare", США) и хранили при -20°C в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl, рН8.0, 100 мМ NaCl, 5 мМ 2-МЕ и 40% глицерин.

Определение активности липазы. Для определения активности липазы использовали два метода – спектрофотометрический и титрование [13]. В первом методе в качестве субстратов использовали 4-нитрофенил бутират (п-НБ, "Sigma" N9876), 4-нитрофенил валерат (п-НВ, "Sigma" N4377), 4-нитрофенил деканоат (п-НД, "Sigma" N0252) и 4-нитрофенил пальмитат (п-НП, "Sigma" N2752). Все субстраты, за исключением п-НП, разводили в чистом ацетонитриле до конечной концентрации 100 мМ. п-НП растворяли в смеси изопропанол-ацетонитрил в соотношении 1 : 1 до концентрации 50 мМ. Реакционная смесь содержала 5 мкМ CaCl₂, 100 мМ Хепес (рН 7.5), 1.25 мкМ субстрата (п-НБ, п-НВ, п-НД или п-НП) и 0.02 мкг фермента в объеме 1 мл. Реакцию останавливали добавлением этанола в объеме, составляющем половину от объема реакционной смеси. Количество освобожденного в результате гидролиза пара-нитрофенола определяли спектрофотометрически при длине волны 405 нм.

Метод титрования использовали для определения активности фермента в отношении триглицеридов (растительное масло). Реакционную смесь, содержащую 100 мкл масла и 100 мкл 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.0), прогревали при температуре проведения реакции в течение 10 мин, затем вносили 10 мкг фермента и инкубировали в течение 2 ч при периодическом перемешивании. По завершении гидролиза к пробе добавляли 10 мл смеси ацетона с этанолом (50 : 50) для растворения масла и остановки реакции. Затем вносили 11 мкл индикатора фенолфталеина (1% в 95%-ном этаноле) и проводили титрование образовавшихся свободных жирных кислот 0.1 М КОН. Определяли процент гидролиза по образовавшимся в образце свободным жирным кислотам от теоретически возможного максимального количества, по следующей формуле [14]:

$$\% \text{ гидролиза} = ((V \times M \times MW) / (Wt \times f)) \times 100,$$

MLKKNSTIALCFLLSFVFNIFLTPVLAQEISSNNKYPIVLVHGLGGFGRDEMLGFKYWG
 GLYDIQEYLKAQGYEVYTVAVGVPVSSNWDRA CELYAQLVGGRRVDYGAANAHAAYGHARYGR
 TYEGLIPDLGKVDPQTGEVKKVHLIGHSMGGQTVRRTLVLQLLAEGDAEERSFPQDNMSPLF
 AGGNWVKSVTITSTPHDGTSLDNAINNGLPWLQSFVGFMSLSTPNSLYDLKLDQWGLT
 RCQGEKVADYLKRVFNSSFWKTSRDLSNWDLTVEGARELNGWVKAQPDVYFYSWATNATR
 KSLFSNYQVPILSMNPFLLYPFALHIGSYTRNIPGQIPIDSSWWPNDGLVSLISQNGPKIN
 STDTIINFNGNPQPGVWNYMGVMDTFDHMDIIGIGTLWNPCPWYLEIAKLLTSLPADYAV
 VADGETENSCSASDLMNPDEAEITATEAADVSGENSTSAETIEENTIISYPDITDIAEE

Рис. 1. Аминокислотная последовательность белкового продукта гена *TSLip1*. Последовательность N-концевого сигнального пептида подчеркнута, консервативный мотив [LIV]-X-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-S-XG-[GSTAC], присутствующий в липазах и эстеразах, выделен серым.

где V – объем, взятой на реакцию KOH, M – молярность KOH (0.1 M), MW – средняя молекулярная масса жирных кислот (г/моль), Wt – вес реакционной смеси, f – доля масла в начале реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация генов, кодирующих липазы, в результате расшифровки нуклеотидной последовательности генома *T. lipolytica*. Традиционный путь поиска нового фермента из микроорганизма, обладающего определенной гидролитической активностью (например, липолитической), предполагает выделение и очистку белка, обладающего соответствующей активностью, из биомассы микроорганизма. В последующем данные об аминокислотной последовательности белка, полученные, например, в результате его секвенирования с N-конца, могут быть использованы для идентификации соответствующего гена путем скрининга библиотеки геномной ДНК микроорганизма или ПЦР-амплификации.

В данной работе для идентификации генов липаз мы использовали другой подход, предполагающий определение нуклеотидной последовательности генома *T. lipolytica* и поиск генов, кодирующих липазы, методами биоинформатики. Секвенирование проводили методом параллельного пиросеквенирования [15]. Была создана и просеквенирована на GS FLX библиотека случайных фрагментов геномной ДНК *T. lipolytica*. Общий объем секвенирования составил около 47.5 млн. нт., что соответствовало примерно 20-кратному перекрытию генома. Полученные последовательности отдельных чтений были собраны в 98 контигов общей длиной около 2.2 млн. нт.

Поиск открытых рамок считывания, потенциально кодирующих белки, проводили с помощью программы Genmark, а предсказание их функций – в результате сравнения с базами данных белковых последовательностей. Всего идентифицировано 7 ферментов, относящихся к классу липаз и эстераз, аминокислотные последовательности двух белков содержали N-концевые сигнальные последовательности, которые могут

обеспечивать их секрецию из клетки. Одна из этих липаз, названная нами *TSLip1*, была выделена и функционально охарактеризована.

Ген *TSLip1* кодирует полипептид длиной 478 а.о., включающий N-концевую сигнальную последовательность длиной 28 а.о. (рис. 1). Анализ аминокислотной последовательности *TSLip1* выявил наличие консервативного мотива [LIV]-X-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-S-XG-[GSTAC], входящего в активный центр эстераз и липаз [16]. В C-концевой области белка отсутствовали трансмембранные домены, которые могут обеспечивать “заякоривание” фермента на поверхности клетки, что свидетельствует о том, что липаза, вероятно, просто секретируется в среду, а не остается связанной с клетками. В результате поиска сходных последовательностей в GenBank было обнаружено, что ближайшими гомологами *TSLip1* являются липазы бактерий типа Firmicutes, – *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum* и *Aneurinibacillus thermoaerophilus* (50–55% идентичности).

Клонирование гена *TSLip1*, экспрессия и очистка рекомбинантного белка. Ген *TSLip1* без последовательности, кодирующей сигнальный пептид, клонировали в экспрессионном векторе pQE80L (“Qiagen”, Германия) таким образом, что синтезируемый рекомбинантный белок *TSLip1* содержал на N-конце 6 аминокислотных остатков гистидина. Экспрессию *TSLip1* проводили в штамме *E. coli* Rosseta-gami (DE3). Полученная экспрессионная система обеспечивала конечный выход *TSLip1* на уровне около 20% от общего растворимого белка (рис. 2). Рекомбинантный белок *TSLip1* очищали с помощью металл-аффинной хроматографии на Ni-NTA колонках. В результате был получен гомогенный препарат белка *TSLip1* (рис. 2).

Гидролитическая активность *TSLip1* в отношении 4-нитрофениловых эфиров. Для определения субстратной специфичности *TSLip1*, а также зависимости активности фермента от температуры, pH и присутствия органических растворителей, в качестве субстратов использовали производные 4-нитрофенила с различной длиной цепи – 4-нитрофенил бутират (C4), 4-нитрофенил валерат

(C5), 4-нитрофенил деканоат (C10) и 4-нитрофенил пальмитат (C16). Известно, что липазы преимущественно гидролизуют длинноцепочечные ацилглицериды, с длиной цепи более 10 атомов углерода, а эстеразы проявляют максимальную активность в отношении короткоцепочечных молекул (C2-C4), а с увеличением длины цепи активность снижается [2, 17]. TSLip1 проявляла максимальную активность в отношении 4-нитрофенил бутирата (C4), при увеличении длины цепи активность сначала снижалась и составляла менее 10% максимальной для 4-нитрофенил деканоата, а затем вновь возрастала для 4-нитрофенил пальмитата (рис. 3а). Таким образом, TSLip1 проявляет активность, характерную как для эстеразы, так и для липазы.

Определение зависимости активности TSLip1 от температуры и pH проводили, определяя эффективность гидролиза на оптимальном субстрате, 4-нитрофенил бутирате. Оптимальная температура реакции составляла 70°C, не менее 80% активности липаза проявляла при 60 и 80°C (рис. 3б). При более высоких температурах активность фермента резко снижалась. Зависимость активности липазы от pH (рис. 3в) определяли в 0.1 М ацетатном (для pH 3.0–5.0), 0.1 М фосфатном (pH 6.0) или в 0.1М трис (pH 6.0–9.0) буферах, проводя реакцию гидролиза 4-нитрофенил бутирата при 70°C. Фермент не проявлял активности при pH ниже 5.0, максимальная активность наблюдалась при pH 8.0, при pH 9.0 активность незначительно снижалась. Нестабильность субстрата в щелочных условиях не позволила провести измерения активности липазы на 4-нитрофенил бутирате при более высоких значениях pH.

Для характеристики термостабильности TSLip1 препарат фермента инкубировали в реакционном буфере при 80°C различное время, затем охлаждали до 60°C, вносили 4-нитрофенил бутират и проводили реакцию при 60°C в стандартном реакционном буфере. Быстрое снижение активности примерно в 3 раза наблюдалось в течение первых 30 мин инкубации при 80°C, в дальнейшем активность снижалась намного медленнее (время 50%-ной инактивации фермента – около 90 мин, рис. 3г). Быстрая первоначальная инактивация фермента при 80°C может объяснять наблюдавшееся резкое снижение активности при температурах выше 80°C, реальный температурный оптимум активности фермента может быть выше 70°C.

Поскольку одним из перспективных направлений практического использования липаз является получение биодизеля из растительных масел, т.е. конверсия триглицеридов растительных масел в эфиры жирных кислот в реакции трансэстерификации с помощью спиртов, обычно этанола или метанола, мы протестировали устойчивость фермента к присутствию этих спиртов в реакци-

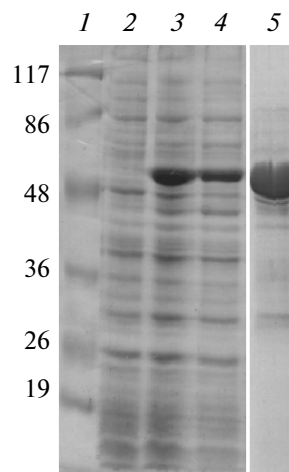


Рис. 2. Экспрессия TSLip1 в *E.coli*. ДДС-Na-ПААГ анализ белковых препаратов. 1 – маркер молекулярной массы (кДа), 2 – суммарный белковый препарат, выделенный из клеток штамма *E. coli* Rosseta-gami (DE3), содержащего плазмиду pQE80-TSLip1, до индукции синтеза TSLip1, 3 – то же, что на дорожке 2, но через 3 ч после индукции синтеза TSLip1 внесением в среду 1мМ ИПТГ, 4 – фракция растворимых белков, через 3 ч после индукции синтеза TSLip1 внесением в среду 1мМ ИПТГ, 5 – очищенный препарат рекомбинантной липазы TSLip1.

онной смеси. Для этого реакцию гидролиза 4-нитрофенил бутирата проводили в присутствии этанола или метанола. Полученные результаты (рис. 3д) показали, что метанол в концентрации до 10% практически не оказывал ингибирующего воздействия на ферментативную реакцию, полное ингибирование активности липазы наблюдалось лишь в присутствии 30% метанола. Этанол вызывал более сильное ингибирование активности TSLip1, наблюдавшееся уже при концентрации 5%, внесение этанола до 20% практически полностью ингибировало реакцию.

Гидролитическая активность TSLip1 в отношении триглицеридов. В ходе экспериментов по культивированию штамма-продуцента TSLip1 на чашках Петри с добавлением в агар 1% трибутирина в условиях индукции экспрессии липазы было обнаружено образование светлых участков вокруг колоний, что указывает на специфический гидролиз субстрата. В качестве природных триглицеридов для функциональной характеристики TSLip1 использовали растительные масла – оливковое, рапсовое, соевое, кукурузное и подсолнечное. Реакцию гидролиза проводили в смеси 0.1 М фосфатный буфер (pH 7.0) – масло (1 : 1), содержащей 0.01% (вес/объем) липазы при 50°C в течение 2 ч при периодическом перемешивании. Активность липазы измеряли методом титрования, количественно определяя образовавшиеся в результате гидролиза субстрата свободные жирные кислоты. Полученные результаты (рис. 4) пока-

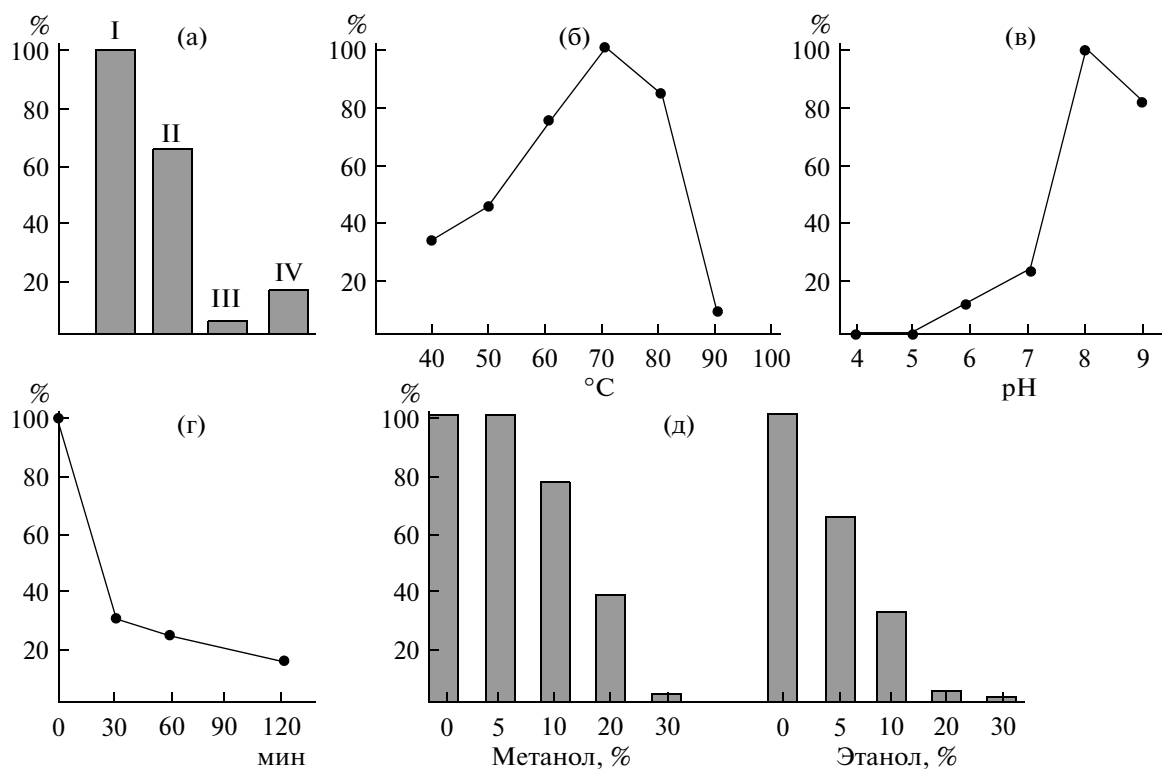


Рис. 3. Гидролитическая активность (%) TSLip1. а – в отношении 4-нитрофениловых эфиров с различной длиной цепи (I – C4, II – C5, III – C10, IV – C16), 70°C, 3 мин.

б – зависимость активности TSLip1 от температуры. Субстрат – 4-нитрофенил бутират. Реакцию проводили в течение 2.5 мин, pH 7.0.

в – зависимость активности TSLip1 от pH буфера. Субстрат – 4-нитрофенил бутират. Реакцию проводили в течение 3 мин, 60°C.

г – термостабильность TSLip1 при 80°C. Фермент инкубировали в реакционном буфере с pH 7.0 при 80°C в течение указанного времени, затем проводили реакцию гидролиза с 4-нитрофенил бутиратом при 60°C в течение 3 мин.

д – зависимость активности TSLip1 от содержания метанола и этанола (%) в реакционной смеси. Субстрат – 4-нитрофенил бутират. Реакцию проводили в течение 3 мин, реакционный буфер с pH 7.0, 70°C.

зывают, что TSLip1 осуществляет гидролиз всех использованных растительных масел, причем максимальная активность наблюдалась в отно-

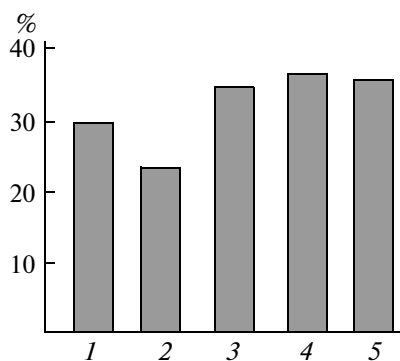


Рис. 4. Гидролиз (%) липазой TSLip1 растительного масла: соевое (1), оливковое (2), кукурузное (3), подсолнечное (4) и рапсовое (5). Реакцию проводили в течение 2 ч, 50°C.

шении подсолнечного, рапсового и кукурузного масел.

Функциональные характеристики и возможные области практического использования TSLip1.

T. lipolytica – липолитическая бактерия, растущая в ассоциации с метаногенными археями на триацилглицеридах, а также линейных насыщенных и ненасыщенных жирных кислотах [7]. Способность к росту на липидах предполагает наличие у бактерии липаз, секретируемых в окружающую среду. В результате расшифровки генома этой бактерии мы идентифицировали гены двух потенциальных липаз, аминокислотные последовательности которых содержали N-концевые сигнальные последовательности, наличие которых свидетельствовало о возможности секреции этих белков из клетки. Один из ферментов, TSLip1, был экспрессирован в *E. coli*, очищен и охарактеризован на модельных субстратах (пара-нитрофениловые эфиры) и растительных маслах. Оптимальные для активности рекомбинантной липазы температура 70°C и pH 8.0 примерно соответство-

вали оптимальным условиям для роста *T. lipolytica* (диапазон температур от 52 до 70°C с оптимумом 60–66°C, диапазон pH от 7.15 до 9.5 с оптимумом 8.1–8.9). В частности, высокий оптимум pH для активности липазы TSLip1 подтверждает предположение о том, что этот фермент секретируется из клеток *T. lipolytica* и гидролизует липиды в окружающей среде.

Ранее из другого штамма *T. lipolytica* были выделены и функционально охарактеризованы две липазы [8]. Подчеркнем, что оба фермента были выделены непосредственно из культуры *T. lipolytica*, однако кодирующие их гены не были идентифицированы и имеющаяся о них информация ограничивалась N-концевыми аминокислотными последовательностями белков длиной 21–22 а.о. [8]. Сравнение этих последовательностей с аминокислотными последовательностями идентифицированных липолитических ферментов, показало, что найденные ферменты отличаются от ранее описанных, более того, указанные в работе [8] аминокислотные последовательности не встречаются в предсказанных белковых продуктах, кодируемых просеквенированным геномом *T. lipolytica*. Охарактеризованные в работе [8] липазы LipA и LipB отличаются от TSLip1 и по некоторым функциональным характеристикам. Так, эти ферменты обладали более высокой термостабильностью, сохраняя более половины активности после 2 ч инкубации при 100°C. Отметим, что TSLip1 менее термостабильна, причем ее термоинактивация была двухступенчатой, — быстрое снижение активности на протяжении первых минут с последующей более медленной инактивацией, что может отражать присутствие в выделенном из клеток *E. coli* препарате рекомбинантного фермента двух фракций, отличающихся фолдингом белка и (или) присутствием стабилизирующих его кофакторов. В целом, отличия термостабильности TSLip1 и липаз, выделенных непосредственно из *T. lipolytica* могут отражать как различия белков, выделенных из разных штаммов, так и быть связанными с тем, что TSLip1 представляет собой рекомбинантный фермент, экспрессированный в *E. coli* и содержащий N-концевую аффинную последовательность, которая может нарушать фолдинг фермента. Экспрессия и характеристика липазы TSLip1, не содержащей дополнительно включенных аминокислотных последовательностей, позволит прояснить эти вопросы.

Получение биодизеля из растительных масел является одной из перспективных биотехнологий, в которых могут быть использованы термостабильные липазы [5]. Эта реакция может осуществляться либо в одну стадию, в реакции трансэстерификации триглицеридов в присутствии спиртов, либо двустадийно, в реакциях гидроэсте-

рификации проводится гидролиз триглицеридов до глицерина и свободных жирных кислот с помощью липазы, а на второй стадии — эстерификация жирных кислот с образованием биодизеля. Чувствительность TSLip1 к высоким концентрациям метанола и этанола, используемых в реакции трансэстерификации, ограничивает ее применение в этой реакции. Липазы LipA и LipB также не проявляют активности в реакции эстерификации с метанолом или этанолом [6]. Напротив, TSLip1, обладающая достаточно высоким температурным оптимумом и активностью в отношении различных растительных масел, может быть использована при получении биодизеля в реакции гидроэстерификации на стадии гидролиза.

Другой практически значимой характеристикой новой липазы является устойчивость к щелочным условиям, в которых она проявляет максимум активности. Ежегодно около 1000 т липаз используются в качестве компонентов моющих средств (детергентов), в основном, это ферменты из мезофильных организмов [6]. Новая алкалолентная липаза может найти свое применение в этой области биотехнологии, а также при проведении органического синтеза и в пищевой промышленности.

Авторы выражают благодарность В.А. Светличному за предоставленный штамм *T. lipolytica* и рекомендации по условиям его культивирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы, государственный контракт П479). Работа В.М. Гумерова поддержана грантом Фонда содействия отечественной науке.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gupta R., Gupta N., Rathi P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. V. 64. № 6. P. 763–781.
2. Sarda L., Desnuelle P. // Biochim. Biophys. Acta. 1958. V. 30. № 3. P. 513–521.
3. Ghosh P.K., Saxena R.K., Gupta R., Yadav R.P., Davidson W.S. // Science Progress. 1996. V. 79. № 2. P. 119–157.
4. Jaeger K.E., Reetz M.T. // Trends Biotechnol. 1998. V. 16. № 9. P. 396–403.
5. Bisen P.S., Sanodiya B.S., Thakur G.S., Baghel R.K., Prasad G.B. // Biotechnol. Lett. 2010. V. 32. № 8. P. 1019–1030.
6. Salameh M., Wiegel J. // Adv. Appl. Microbiol. 2007. V. 61. P. 253–283.
7. Svetlitsnyi V., Rainey F., Wiegel J. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. V. 46. № 8. P. 1131–1137.
8. Salameh M.A., Wiegel J. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 23. P. 7725–7731.
9. Salameh M.A., Wiegel J. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 36. № 10. P. 1281–1287.

10. Freier D., Mothershed C.P., Wiegel J. // Appl. Environ. Microbiol. 1988. V. 54. № 1. P. 204–211.
11. Besemer J., Borodovsky M. // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33 (Web Server issue). W. 451–454.
12. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. № 17. P. 3389–3402.
13. Gupta R., Rathi P., Gupta N., Bradoo S. // Biotechnol. Appl. Biochem. 2003. V. 37. № 1. P. 63–71.
14. Rooney D., Weatherley L.R. // Process Biochem. 2001. V. 36. № 1. P. 947–953.
15. Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka J., Braverman M.S., Chen Y.J., Chen Z., Dewell S.B., Du L., Fierro J.M., Gomes X.V., Godwin B.C., He W., Helgesen S., Ho C.H., Irzyk G.P., Jando S.C., Alenquer M.L.I., Jarvie T.P., Jirage K.B., Kim J.B., Knight J.R., Lanza J.R., Leamon J.H., Lefkowitz S.M., Lei M., Li J., Lohman K.L., Lu H., Makhijani V.B., McDade K.E., McKenna M.P., Myers E.W., Nickerson E., Nobile J.R., Plant R., Puc B.P., Ronan M.T., Roth G.T., Sarkis G.J., Simons J.F., Simpson J.W., Srinivasan M., Tartaro K.R., Tomasz A., Vogt K.A., Volkmer G.A., Wang S.H., Wang Y., Weiner M.P., Yu P., Begley R.F., Rothberg J.M. // Nature. 2005. V. 437. № 7057. P. 376–380.
16. Blow D. // Nature. 1990. V. 343. № 6260. P. 694–695.
17. Liu A.M.F., Somers N.A., Kazlauskas R.J., Brush T.S., Zocher F., Enzelberger M.M., Bornscheuer U.T., Horsman G.P., Mezzetti A., Schmidt-Dannert C., Schmid R.D. // Tetrahedron Asymmetry. 2001. V. 12. № 4. P. 545–556.
18. Cavalcanti-Oliveira E., da Silva P.R., Ramos A.P., Aranda D.A., Freire D.M. // Enzyme Res. 2011. Article ID 618692.

Isolation and Functional Characterization of Lipase from the Thermophilic Alkali-Tolerant Bacterium *Thermosyntropha lipolytica*

V. M. Gumerov, A. V. Mardanov, P. M. Kolosov, and N. V. Ravin

Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

e-mail: nravin@biengi.ac.ru

Received November 3, 2011

Abstract—As a result of sequencing the genome of the thermophilic alkali-tolerant lipolytic bacterium *Thermosyntropha lipolytica*, the gene encoding a lipase secreted into the medium was identified. The recombinant enzyme was expressed in *Escherichia coli*. It was isolated, purified, and functionally characterized. The lipase exhibited hydrolytic activity toward *para*-nitrophenyl esters of various chain lengths, as well as triglycerides, including vegetable oils. The optimal reaction conditions were achieved at temperatures from 70 to 80°C and pH 8.0. Enzyme saved more than 80% of its activity in the presence of 10% methanol. This new thermostable lipase may be a promising biocatalyst for organic synthesis; it may find application in the food and detergent industry and biodiesel production.