

УДК 579.25

**ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ, КОДИРУЕМЫЕ  
ГЕНОМом ТЕРМОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ  
THERMOSYNTROPHA LIPOLYTICA**

**Марданов А.В., Белецкий А.В., Равин Н.В.**

ФГБУН Центр «Биоинженерия» Российской академии наук, Москва, e-mail: nravin@mail.ru

Термофильная анаэробная бактерия *Thermosyntropha lipolytica*, выделенная из щелочного озера Богория в Кении, способна расщеплять триглицериды и утилизировать жирные кислоты в симбиотическом синтрофном сообществе с метаногенными археями. В отсутствие симбионтов эта бактерия может сбраживать некоторые белковые субстраты. В результате определения полной нуклеотидной последовательности генома *T. lipolytica* идентифицирован набор гидролитических ферментов этой бактерии. Анализ аминокислотных последовательностей позволил идентифицировать ферменты, содержащие N-концевые сигнальные последовательности, которые могут обеспечивать секрецию из клетки в окружающую среду. Среди этих ферментов обнаружены протеазы различных типов, липазы и гликозил-гидролазы. Наличие этих секретируемых гидролаз объясняет способность *T. lipolytica* расти на белковых субстратах и липидах и свидетельствует о том, что эта бактерия может также обладать способностью использовать для роста и некоторые полисахариды. Идентифицированные гидролитические ферменты, активные при высокой температуре в щелочных условиях, перспективны для применения в промышленной биотехнологии.

**Ключевые слова:** бактерия, геном, протеаза, липаза, термоалкалофил

**HYDROLYTIC ENZYMES ENCODED IN THE GENOME  
OF THERMOALKALIPHILIC BACTERIUM  
THERMOSYNTROPHA LIPOLYTICA**

**Mardanov A.V., Beletskiy A.V., Ravin N.V.**

Centre «Bioengineering» of the Russian academy of sciences, Moscow, e-mail: nravin@mail.ru

Thermophilic anaerobic bacterium *Thermosyntropha lipolytica*, isolated from a soda Lake Bogoria, Kenya, is able to hydrolyse triglycerides and utilize the liberated fatty acids in a syntrophic symbiotic association with a methanogenic archaeon. In the absence of syntrophic partner this bacterium is able to grow by fermentation on some proteinaceous substrates. Upon sequencing of the complete genome of *T. lipolytica* we identified a set of hydrolytic enzymes of this bacterium. Analysis of predicted amino acid sequences allowed to identify enzymes containing N-terminal signal sequences responsible for secretion of these enzymes out of the cell to the external medium. Proteases of different families, lipases and glycosyl hydrolases were found among these secreted enzymes. The presence of secreted hydrolases of these classes could explain the ability of *T. lipolytica* to grow on proteinaceous substrates and lipids, and suggest that this bacterium may be able to utilize some polysaccharides. Identified hydrolytic enzymes, active at high temperatures under alkaline conditions, may be used in different areas of industrial biotechnology.

**Keywords:** bacteria, genome, protease, lipase, thermoalkaliphile

Объектом исследования является термофильная анаэробная бактерия *Thermosyntropha lipolytica*, которая была выделена из щелочного озера Богория в Кении [9]. Этот относящийся к порядку *Clostridiales* микроорганизм растет в широком диапазоне температур от 52 до 70 °C при щелочных значениях pH (7,15–9,5). В чистой культуре эта бактерия может расти на различных белковых субстратах (дрожжевой экстракт, триптон, мясной экстракт и др.), а также кротонате [9]. Основным продуктом сбраживания этих субстратов является ацетат. Слабый рост наблюдался также на пирувате, рибозе и ксилане [9]. Особенностью *T. lipolytica* является способность расщеплять триглицериды (напр. растительного масла) и утилизировать жирные кислоты при росте в синтрофном симбиотическом сообществе с метаногенной археей (род *Methanobacterium*). В природе синтрофный метаболизм является важной промежуточной стадией в анаэробной конверсии био-

полимеров, таких как полисахариды, белки и липиды до углекислого газа и метана [8]. В реакциях метаногенеза архея использует водород и поддерживает его концентрацию на очень низком уровне, делаящим сбраживание жирных кислот энергетически выгодным для *T. lipolytica* [9]. Синтрофный рост на липидах обеспечивается за счет липаз, секретируемых из клетки в окружающую среду [7]. При росте в отсутствие синтрофного партнера липазы также синтезируются и секретируются из клетки, однако в этих условиях *T. lipolytica* не способна использовать жирные кислоты и, следовательно, расти на липидах.

Способность микроорганизма использовать в качестве субстратов для роста сложные полимерные субстраты (белки, липиды, полисахариды и др.), которые не могут транспортироваться в клетку без предварительного расщепления, определяется наличием у него соответствующих гидролитических ферментов, секретируемых

из клетки в окружающую среду. Идентифицировать такие ферменты можно в результате выделения, очистки и биохимической характеристики «внеклеточных» белков с последующим определением N-концевой аминокислотной последовательности белка и кодирующего его гена. Однако, помимо сложности и трудоемкости этих операций, немаловажным является тот факт, что далеко не все ферментативные активности, закодированные в геноме, экспрессируются при лабораторном культивировании микроорганизма, и подавляющее большинство их остается неизвестным исследователям. В последнее десятилетие в мировой практике расширилось применение нового подхода к поиску ферментов – определение полной геномной последовательности микроорганизма, позволяющее идентифицировать не какой-то один, а большую часть его ферментов (в оптимальном варианте – все) в результате анализа нуклеотидной последовательности. Ферменты, кодируемые идентифицированными генами, могут быть затем клонированы и экспрессированы в стандартных бактериях-продуцентах, таких как *Escherichia coli*. Таким образом, анализ геномных данных позволяет предсказать пути метаболизма микроорганизма и потенциальные субстраты для его роста, неизвестные из результатов его микробиологической характеристики в лабораторных условиях.

**Цель исследования:** идентифицировать в результате расшифровки геномной последовательности и охарактеризовать биоинформационными методами секретируемые гидролитические ферменты, кодируемые геномом *T. lipolytica*.

#### Материалы и методы исследования

Штамм *T. lipolytica* был выделен В.А. Светличным из щелочного озера Богория в Кении [9] и предоставлен нам для проведения данной работы. Нуклеотидная последовательность генома этой бактерии была определена нами методом пиросеквенирования на геномном анализаторе GS FLX [1]. Поиск открытых рамок считывания, способных кодировать белки, осуществляли с помощью программы GeneMark [4]. Для предсказания функций белков соответствующие аминокислотные последовательности сравнивали с базой данных NCBI с помощью BLASTP. Анализ аминокислотных последовательностей белков с целью идентификации N-концевых сигнальных последовательностей проводили с помощью программы SignalP v. 3.0 для грамположительных бактерий [3].

#### Результаты исследования и их обсуждение

Поиск гомологов белковых продуктов, предсказанных открытых рамок считывания, кодируемых в геномных последовательностях *T. lipolytica* по базе данных NCBI по-

зволил идентифицировать гидролитические ферменты различных классов. Для изучения путей метаболизма *T. lipolytica* и возможности использования этой бактерией различных полимерных субстратов интерес представляют ферменты, секретируемые из клетки в окружающую среду. Для поиска таких ферментов с использованием программы SignalP 3.0 был проведен анализ того, содержат ли аминокислотные последовательности кодируемых белков N-концевые сигнальные последовательности, необходимые для секреции из клетки. Список гидролитических ферментов, в которых были идентифицированы такие сигнальные последовательности, приведен в таблице.

Наибольшую долю среди потенциально секретируемых гидролаз составляют протеолитические ферменты различных типов, что согласуется с возможностью роста *T. lipolytica* на белковых субстратах. Отметим, что не все пептидазы, содержащие сигнальные пептиды, обязательно участвуют в деградации присутствующих в среде белков, некоторые из них могут обеспечивать процессинг собственных белков клетки.

В гидролизе внеклеточных белков, вероятно, ключевую роль играет продукт гена 1588, Tlip\_1588. Этот фермент является сериновой протеазой семейства S8/S53, аналогом субтилизина. Его гомологи кодируются в геномах многих протеолитических термофильных бактерий и архей (напр. пирозин в *Pyrococcus furiosus* DSM3638), некоторые из них функционально охарактеризованы. Ближайшие гомологи Tlip\_1588 найдены в геномах родственных *T. lipolytica* термофильных фирмикот родов *Thermaerobacter*, *Thermincola* и *Tepidanaerobacter*. Аминокислотная последовательность протеазы Tlip\_1588 содержит три копии SLH домена (S-layer domain, pfam00395) в N-концевой области и каталитический домен первого субсемейства пептидаз семейства S8 (Peptidase S8 family domain, subfamily 1). Многие функционально охарактеризованные гомологи Tlip\_1588 активны при высоких температурах в присутствии денатурирующих агентов [2] и рассматриваются в качестве перспективных ферментов для биотехнологического применения.

Важную роль в гидролизе белковых субстратов вне клетки может также играть Tlip\_1807. Это сериновая протеаза, относящаяся к трипсиноподобным ферментам. Она содержит C-концевой PDZ домен, вовлеченный в белок-белковые взаимодействия и обеспечивающий распознавание субстрата. Аналогичную доменную структуру («трипсиновый» домен и PZD домен) имеет трипсиноподобная протеаза Tlip\_2148.

Гидролитические ферменты *T. lipolytica*, содержащие N-концевые сигнальные последовательности

Ген	Предсказанная функция белка	Размер белка (а.о.)	Длина сигнального пептида (а.о.)	Вероятность наличия сигнального пептида
<i>Протеолитические ферменты</i>				
68	Пептидаза семейства M23B	385	32	1.000
69	Серинования пептидаза семейства S41, процессирующая С-конец белков	372	23	0.915
292	Пептидаза семейства M23B	287	26	0.997
1204	Карбоксипептидаза семейства M14	466	26	1.000
1317	Сигнальная пептидаза, сериновая пептидаза семейства S49 (класс ClpP)	298	28	0.999
1588	Сериновая протеаза семейства S8/S53	1051	26	1.000
1728	Карбоксипептидаза серинового типа	376	31	0.981
1807	Сериновая протеаза, трипсин	359	24	0.966
2037	Пептидаза семейства M50	237	38	1.000
2038	Металлоэндопептидаза	190	28	0.999
2148	Пептидаза семейства S1/S6, хемотрипсин	382	45	0.861
2235	Пептидаза семейства M48	311	39	0.640
2258	Карбоксипептидаза серинового типа	384	30	1.000
<i>Липолитические ферменты</i>				
786	Липаза	478	28	1.000
1200	Липаза	523	31	0.999
<i>Ферменты, участвующие в гидролизе полисахаридов</i>				
937	Гликозил гидролаза семейства GH18	270	25	1.000
1727	Полисахарид деацетилаза	242	30	0.818
2341	Полисахарид деацетилаза	247	36	0.998

Функции остальных протеаз, последовательности которых содержат сигнальные пептиды, либо неясны, либо связаны с клеточным метаболизмом. Так, Tlip\_0069 относится к С-концевым пептидазам, которые участвуют в деградации некорректно синтезированных белков и защите от теплового и осмотического стресса. Tlip\_1204 – карбоксипептидаза семейства M14, гомологичные ей ферменты участвуют в процессах споруляции. Tlip\_1317 – сигнальная пептидаза, обеспечивающая процессинг сигнальных пептидов. Tlip\_2037 – металлопротеаза семейства M50, представители которого также принимают участие в споруляции.

Внеклеточный гидролиз липидов по всей вероятности обеспечивается двумя липазами, кодируемыми генами Tlip\_0788 и Tlip\_1200. Ранее из *T. lipolytica* были выделены и функционально охарактеризованы две липазы, проявлявшие максимум активности при температуре около 96°C и pH 9,5 [7], однако соответствующие гены не были идентифицированы. Недавно мы клонировали, экспрессировали в *E. coli* и функционально охарактеризовали рекомбинантную липазу, являющуюся

продуктом гена Tlip\_0788 [1]. Было установлено, что эта липаза способна осуществлять гидролиз триацилглицеридов, в том числе растительных масел, на которых *T. lipolytica* способна расти в ассоциации с метаногенными археями.

Лишь три «внеклеточных» фермента могут принимать участие в процессах утилизации полисахаридов. Это гликозил-гидролаза семейства GH18, включающего хитиназы II типа [6], и две полисахарид деацетилазы, возможно, обладающие хитиндеацетилазной активностью. Возможность роста *T. lipolytica* на хитине не была исследована, однако известно, что этот полимер в больших количествах имеется в содовых озерах, являясь компонентом панциря обитающих в них креветок рода *Artemia* [5]. Отсутствие других секретлируемых гликозил-гидролаз согласуется с неспособностью *T. lipolytica* расти на полисахаридных субстратах [9].

**Выводы**

Геном термоалкалофильной бактерии *T. lipolytica* кодирует набор гидролитических ферментов, которые могут секретироваться из клетки в окружающую среду.

Идентифицированные протеазы различных типов и липазы обеспечивают использование *T. lipolytica* белковых субстратов и липидов соответственно. Идентифицированные гидролитические ферменты, активные при высокой температуре в щелочных условиях, перспективны для применения в промышленной биотехнологии.

*Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы, государственный контракт П479).*

#### Список литературы

1. Гумеров В.М., Марданов А.В., Колосов П.М., Равин Н.В. Выделение и характеристика липазы из термоалкалофильной бактерии *Thermosyntropha lipolytica* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48. – № 4. – С. 376–382.
2. Antranikian G., Vorgias C.E., Bertoldo C. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 2005. – Vol. 96. – P. 219–262.
3. Bendtsen J.D., Nielsen H., von Heijne G., Brunak S.J. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0 // J. Mol. Biol. – 2004. – Vol. 340(4). – P. 783–795.
4. Besemer J., Borodovsky M. GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses // Nucleic Acids Res. – 2005. – Vol. 33. – P. 451–454.
5. Gooday G. The ecology of chitin degradation. In: Marshall K. (ed) Advances in microbial ecology. – 1990 – Plenum Press, New York. – P. 387–430.
6. Karlsson M., Stenlid J. (2008) Evolution of family 18 glycoside hydrolases: diversity, domain structures and phylogenetic relationships // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 16 (3–4). – P. 208–223.
7. Salameh M.A., Wiegel J. Purification and characterization of two highly thermophilic alkaline lipases from *Thermosyntropha lipolytica* // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – Vol. 73(23). – P. 7725–7731.
8. Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1997. – Vol. 61. – P. 262–280.
9. Svetlitsnyi V., Rainey F., Wiegel J. *Thermosyntropha lipolytica* gen. nov., sp. nov., a lipolytic, anaerobic, alkalitolerant, thermophilic bacterium utilizing short and long chain fatty acids in syntrophic coculture with a methanogenic archaeum // Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. Vol. 46. pp. 1131–1137.

ant, thermophilic bacterium utilizing short and long chain fatty acids in syntrophic coculture with a methanogenic archaeum // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1996. – Vol. 46. – P. 1131–1137.

#### References

1. Gumerov V.M., Mardanov A.V., Kolosov P.M., Ravin N.V. Vydelenie i kharakteristika lipazy iz termoalkalofil'noj bakterii *Thermosyntropha lipolytica* // Prikladnaja biokhimiya i mikrobiologija. 2012. T.48, no. 4. pp. 376–382.
2. Antranikian G., Vorgias C.E., Bertoldo C. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2005 Vol. 96, pp. 219–262.
3. Bendtsen J.D., Nielsen H., von Heijne G., Brunak S.J. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0 // J. Mol. Biol. 2004 Vol. 340(4), pp. 783–795.
4. Besemer J., Borodovsky M. GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses // Nucleic Acids Res. 2005 Vol. 33, pp. 451–454.
5. Gooday G. The ecology of chitin degradation. In: Marshall K. (ed) Advances in microbial ecology. 1990 Plenum Press, New York, pp. 387–430.
6. Karlsson M., Stenlid J. (2008) Evolution of family 18 glycoside hydrolases: diversity, domain structures and phylogenetic relationships // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2009 Vol. 16 (3–4), pp. 208–223.
7. Salameh M.A., Wiegel J. Purification and characterization of two highly thermophilic alkaline lipases from *Thermosyntropha lipolytica* // Appl. Environ. Microbiol. 2007 Vol. 73(23), pp. 7725–7731.
8. Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997 Vol. 61, pp. 262–280.
9. Svetlitsnyi V., Rainey F., Wiegel J. *Thermosyntropha lipolytica* gen. nov., sp. nov., a lipolytic, anaerobic, alkalitolerant, thermophilic bacterium utilizing short and long chain fatty acids in syntrophic coculture with a methanogenic archaeum // Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. Vol. 46. pp. 1131–1137.

#### Рецензенты:

Бонч-Осмоловская Е.А., д.б.н., зам. директора по научной работе ФГБУН Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук, г. Москва;

Замчук Л.А., д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУН Центра «Биоинженерия» Российской академии наук, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 07.11.2012.