

УДК 579.66

## ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЫСОКОСТАБИЛЬНЫЕ ЩЕЛОЧНЫЕ ПЕПТИДАЗЫ АЛКАЛОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ *Alkalicaulis satelles* И *Aliidiomarina* sp., ПЕРСПЕКТИВА ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В СОСТАВЕ ДЕТЕРГЕНТОВ

© 2021 г. Е. В. Лаврентьева<sup>1,2,\*</sup>, Е. Б. Эрдынеева<sup>1</sup>, Я. Е. Дунаевский<sup>3</sup>,  
Ю. В. Болтянская<sup>4</sup>, В. В. Кевбрин<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, 670047 Россия

<sup>2</sup>Бурятский государственный университет им. Д. Банзарова, Улан-Удэ, 670000 Россия

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

<sup>4</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр  
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

\*e-mail: lena\_l@mail.ru

Поступила в редакцию 30.04.2021 г.

После доработки 30.06.2021 г.

Принята к публикации 02.07.2021 г.

Изучена пептидазная активность в культуральной среде алкалофильных протеолитических бактерий *Alkalicaulis satelles* G-192<sup>T</sup> и *Aliidiomarina* sp. P-156, выделенных из системы гиперсоленых щелочных озер Танатар (Алтайский край, Россия). Обнаружено, что секретируемые пептидазы штаммов G-192 и P-156 способны гидролизовать *n*-нитроанилидные субстраты, проявляя максимальную активность при гидролизе аминокислотного субстрата LpNa. Анализ частично очищенных препаратов пептидаз из штаммов G-192 и P-156 показал, что исследуемые ферменты отличались наибольшей активностью и стабильностью при pH от 8.4 до 11. Ферменты штаммов G-192 и P-156 были высокостабильными по отношению к NaCl, сохраняя активность при 220 и 70 г/л NaCl соответственно. Данные ингибиторного анализа и субстратной специфичности внеклеточных ферментов указывают на их принадлежность к классу металлопептидаз аминокислотного типа. Щелочные пептидазы показали значительную устойчивость к поверхностно-активным веществам тритон X-100, ДДС-Na и окислителю H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и могут быть использованы при разработке новых моющих средств.

**Ключевые слова:** алкалофильные бактерии, стабильные щелочные пептидазы, биотехнологический потенциал, детергенты

**DOI:** 10.31857/S0555109921060088

Пептидазы (ЕС 3.4.21) обнаружены у всех групп живых организмов и представляют собой отдельную подгруппу гидролитических ферментов, способных к гидролизу пептидных связей в белках и пептидах. Эти ферменты разнообразны по структуре и свойствам, выполняют множество сложных биологических функций и участвуют в биогеохимическом цикле углерода и азота [1]. В коммерческом отношении пептидазы бактерий являются наиболее ценной группой ферментов, на долю которых приходится 60% общемировых продаж промышленных ферментов [2]. Щелочные пептидазы уникальны по стабильности в широком диапазоне температур, pH и концентраций NaCl и широко используются в пищевой и кормовой промышленности, в медицине, а также при переработке органических отходов [3, 4]. Одним из основных применений этих пептидаз является производство моющих средств, поскольку

pH стиральных порошков находится в диапазоне pH 7–11. Щелочные пептидазы используются в различных составах моющих средств вместе с другими гидролитическими ферментами в качестве добавок для облегчения расщепления и высвобождения белковых загрязнений [5].

Важным источником щелочных ферментов являются алкалофильные бактерии из местообитаний с высоким значением pH. К таким, в частности, принадлежат содовые озера, представляющие естественную среду обитания алкалофилов, относящихся к экстремальным микроорганизмам. Исследование секреции внеклеточных пептидаз у новых представителей экстремофильных бактерий дает возможность выявлять природные штаммы с различным спектром секретируемых пептидаз, обладающих высокой ферментативной активностью. Потенциал пептидаз бактерий из содовых озер рассмотрен в работах [6, 7]. Показано, что щелочные

пептидазы бактерий рода *Bacillus*, — благодаря высокому уровню их стабильности и способности к разложению широкого спектра субстратов, доминируют на коммерческом рынке. Секвенирование и аннотирование геномов позволило выявить высокий потенциал секретируемых щелочных пептидаз у этой группы бактерий для практического применения [8].

Однако в связи с непрерывным развитием технологий и ужесточением экологических норм поиск новых видов алкалофильных бактерий из природных местообитаний, способных продуцировать стабильные щелочные ферменты, остается актуальным направлением в современной микробиологии. В последние годы внимание исследователей привлечено к таксономическим группам бактерий, выделенным из содовых озер и способным активно секретировать щелочные пептидазы: *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Geomicrobium*, *Salipaludibacillus*, *Brachy bacterium*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Halomonas* и *Alkalibacillus* [9–13].

Цель работы — поиск и характеристика внеклеточных щелочных пептидаз у двух штаммов новых алкалофильных бактерий родов *Alkalicaulis* и *Aliidiomarina*, оценка возможности их применения в составе синтетических моющих средств (детергентов).

## МЕТОДИКА

**Культивирование штаммов-продуцентов.** Штамм G-192 культивировали на среде следующего состава (г/л):  $\text{NaHCO}_3$  — 13,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  — 46,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0.3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0.12,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  — 0.015, дрожжевой экстракт — 0.1 и 1.0 мл раствора микроэлементов [15]. Рост штамма P-156 поддерживали на среде следующего состава (г/л):  $\text{NaCl}$  — 30,  $\text{NaHCO}_3$  — 7,  $\text{NaHCO}_3$  — 23,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0.3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0.12,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  — 0.015, дрожжевой экстракт — 0.1 и 1.0 мл раствора микроэлементов [15]. В качестве индуктора пептидаз в среды добавляли казеинат натрия — 2.0 г/л. Штаммы выращивали в 250 мл среды в конических колбах без перемешивания при pH 9. Инкубацию проводили в течение 48–72 ч при температуре 35°C. После окончания роста клетки отделяли от среды центрифугированием 10000 g в течение 5 мин при 4°C и отбрасывали. Собранную бесклеточную культуральную жидкость хранили в холодильнике при 4°C для дальнейшей работы.

**Определение протеолитической активности.** Внеклеточную протеолитическую активность ферментов, содержащихся в полученных супернатантах определяли согласно методу Эрлангера [16]. В работе использованы следующие *n*-нитроанилидные субстраты, специфичные для эндопептидаз определенного типа или класса): G1pAALpNA (пироглутамил-аланил-аланил-лейцин-*n*-нитро-

анилид) — для субтилизин-подобных пептидаз; VzRpNA (N-бензоил-L-аргинил-*n*-нитроанилид) — для трипсин-подобных пептидаз; G1pFpNA (пироглутамил-фенилаланил-*n*-нитроанилид) — для хитотрипсин-подобных пептидаз; G1pFApNA (пироглутамил-фенилаланил-аланил-*n*-нитроанилид) — для цистеиновых пептидаз. Субстраты для аминокислотных пептидаз: LpNA (L-лейцил-*n*-нитроанилид); FpNA (L-фенилаланил-*n*-нитроанилид).

Эти субстраты содержат аналог пептидной связи, которая расщепляется под действием протеолитических ферментов. В результате расщепления выделяется *n*-нитроанилин, окрашивающий раствор в желтый цвет. Все субстраты вносили в концентрации 5 мМ.

Для измерения активности пептидаз в ячейку микропланшета вносили 160 мкл 0.1 М фосфатного буфера, pH 7.0, добавляли 10–20 мкл культуральной жидкости, 5 мкл соответствующего субстрата и измеряли оптическое поглощение раствора в начальный момент времени. Затем поглощение измеряли через 12 ч инкубации при 37°C. Количество образовавшегося *n*-нитроанилина определяли спектрофотометрически при 405 нм на микропланшетном фотометре StatFax 2100 (“Awareness Technology”, США), используя дифференциальный фильтр 405 нм. За 1 единицу активности (U) принимали изменение оптической плотности (ОП) опытных растворов относительно контрольных на 0.01 за 12 ч при 405 нм и 37°C. В качестве контроля использовали ОП реакционной смеси, измеренную сразу после добавления субстрата. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при 280 нм. При определении активности цистеиновых пептидаз к реакционной смеси дополнительно добавляли 5 мкл свежеприготовленного раствора дитиотреитола с концентрацией 10 мг/мл.

**Очистка пептидаз.** Щелочные пептидазы штаммов G-192 и P-156 очищали, используя осаждение сульфатом аммония с последующей ионообменной хроматографией и гель-фильтрацией. На первом этапе белок из супернатанта культуральной жидкости осаждали сульфатом аммония, внесенного до насыщения 60%. Растворы оставляли при 4°C на ночь, чтобы обеспечить более полное осаждение белка. После этого осадок отделяли центрифугированием при 10000 g в течение 15 мин, затем растворяли в небольшом объеме 0.1 М фосфатного буфера pH 7.0. Полученный раствор обессоливали диализом против 0.1 М фосфатного буфера при 4°C в течение 24 ч, определяли содержание белка и анализировали наличие активности пептидаз.

Ионообменную хроматографию осуществляли на колонке Mono Q (FPLC), уравновешенной 0.01 М фосфатным буфером, pH 7.0. Белок, сорбирующийся на колонке, элюировали градиен-

том NaCl (0–1 М) со скоростью 1 мл/мин. Фракции (1 мл) собирали, анализировали на содержание белка и протеолитическую активность. Активность измеряли по выбранным субстратам при 405 нм. Фракции, проявляющие протеолитическую активность, объединяли. Объединенные фракции подвергали гель-фильтрации с использованием колонки, заполненной Superdex 75, 60 × 1 см (“Pharmacia”, Швеция). Элюирование проводили 0.01 М фосфатным буфером, pH 7, со скоростью 1 мл/мин. Все фракции были проанализированы на протеолитическую активность и содержание белка.

**Определение оптимума pH-активности и pH-стабильности фермента.** При определении pH оптимума секретируемой пептидазы по отношению к синтетическим субстратам был использован универсальный буфер в диапазоне pH 2–11 с шагом 1. В состав буфера входили: 0.02 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 0.02 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 0.02 М  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Необходимое значение pH получали, добавляя к смеси кислот 0.02 М NaOH. После инкубации 10 мкл препарата фермента с 20 мкл буфера определенного pH и 5 мкл субстрата при 37°C к каждой пробе добавляли 160 мкл 0.1 М фосфатного буфера pH 7.5 и измеряли поглощение как описано выше.

Для определения pH стабильности ферментный препарат инкубировали 4 ч при 37°C в универсальном буферном растворе с pH от 2 до 11, затем образцы доводили до pH 7.5 с помощью 0.1 М фосфатного буфера, pH 7.5 при pH от 8.0, либо 0.1 М NaOH в при pH до 8.0. Активность ферментов определяли по методу, описанному выше.

**Определение температурного оптимума и стабильности фермента.** Определение температурного оптимума фермента проводили в диапазоне температур от 5 до 65°C. Для изучения температурной стабильности раствор фермента инкубировали при тех же температурах в течение 4 ч, затем приводили к комнатной температуре и определяли активность при 37°C, как указано выше.

**Определение оптимума концентрации хлорида натрия для исследуемого фермента.** При определении оптимума концентрации хлорида натрия для проявления активности секретируемой пептидазы были подготовлены солевые растворы с концентрацией от 0 до 300 г/л (0, 10, 30, 50, 80, 100, 150, 200, 250, 300 г/л). Фермент инкубировали в растворах хлорида натрия и определяли активность, как указано выше. Для определения стабильности пептидазы выдерживали в течение 4 ч при 37°C при различных концентрациях хлорида натрия, а затем добавляли специфичный *n*-нитроанилидный субстрат и определяли активность.

**Определение влияния специфических ингибиторов на ферментативную активность.** Ингибиторный анализ проводили с очищенными ферментными препаратами и с культуральной жидкостью.

В работе использовали специфические ингибиторы: – ФМСФ (фенилметилсульфонилфторид) для сериновых пептидаз; ЭДТА (этилендиаминтетраацетат натрия) для металлопептидаз; ЙАА (2-йодацетамид) для цистеиновых пептидаз.

К 50 мкл раствора фермента добавляли 5 мкл раствора ингибитора определенной концентрации (0.01 и 0.1 М) и выдерживали смесь 50–60 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 700 мкл фосфатного буфера (0.1 М, pH 8) и 10 мкл раствора соответствующего *n*-нитроанилидного субстрата и определяли остаточную активность пептидазы. Ферментативную активность в отсутствие ингибиторов использовали в качестве контроля.

Для приготовления растворов ингибиторов ЭДТА и ЙАА растворяли в фосфатном буфере (0.1 М, pH 8), а ФМСФ в этаноле; в тех случаях, когда используемый ингибитор был растворен в спирте, в качестве контроля к раствору фермента добавляли 5 мкл спирта.

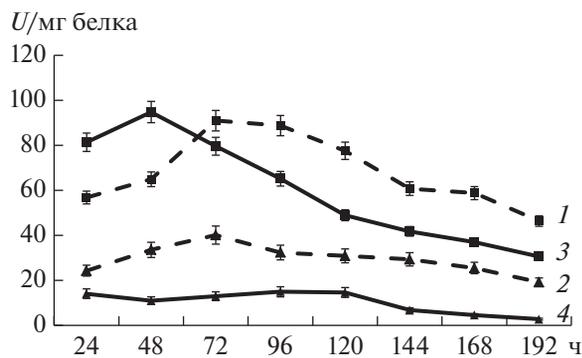
**Влияние поверхностно-активных веществ и окислителя на стабильность пептидаз.** Влияние некоторых поверхностно-активных веществ (ПАВ), таких как тритон X-100 (неионное ПАВ), ДДС-Na (анионное ПАВ) и окислителя (пероксид водорода) на стабильность фермента изучали путем инкубации ферментов в течение 4 ч при 37°C с указанными добавками. После инкубационного периода измеряли остаточную активность пептидазы в стандартных условиях анализа. Активность фермента без добавок принимали за 100%.

Концентрации тритон X-100 и ДДС-Na составляли 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0% и 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8% соответственно. Пероксид водорода добавляли в концентрациях 0.5, 1.0 и 3.0%.

**Статистический анализ.** Эксперименты проводили в трех повторностях, результаты обрабатывали с использованием программного пакета Microsoft Excel 2013. Для полученных результатов рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Штаммы – продуценты.** Штаммы новых аэробных алкалофильных бактерий, использованных в работе, были выделены из разных щелочных биоценозов. Штамм G-192 был выделен из лабораторного консорциума галоалкалофильной цианобактерии *Geitlerinema* sp. Z-T0701 с ее естественными хемоорганотрофными спутниками [15]. Синтез протеолитических ферментов у этого штамма, вероятно, связан с обитанием в природном микробном консорциуме за счет утилизации отмирающих клеток или прижизненных белковых выделений цианобактерии, являясь деструктором (или редуцентом, в современной терминологии) биомассы первичного продуцента. Учитывая место



**Рис. 1.** Активность пептидаз (удельная активность, U/мг белка) на разных субстратах: 1 – пептидаза штамма G-192 на субстрате LpNa, 2 – пептидаза штамма G-192 на субстрате GlpAALpNa, 3 – пептидаза штамма P-156 на субстрате LpNa, 4 – пептидаза штамма P-156 на субстрате GlpAALpNa.

штамма G-192 в трофической цепи, представляло интерес выяснить, какими пептидазами располагает деструктор для выполнения своей роли в алкалофильном микробном сообществе. По таксономическому положению штамм G-192 образовал новый род и вид – *Alkalicaulis satelles* G-192<sup>T</sup> gen. nov., sp. nov. в составе нового семейства *Maricaulaceae* fam. nov. (VKM B-3306<sup>T</sup>, KCTK 72746<sup>T</sup>) [15]. Штамм P-156 был выделен из прибрежных осадков озера Петуховское (Алтайский край, Россия), из мест, где наблюдалось спонтанное разложение альго-цианобактериальной биомассы. Так же, как и штамм G-192, штамм P-156 был выделен как протеолитик для выяснения его роли в алкалофильном микробном сообществе. На основании филогенетического анализа штамм P-156 оказался в кластере *Aliidiomarina* (семейство *Idiomarinaceae*), где он, по-видимому, образует новый вид.

**Субстратная специфичность внеклеточных пептидаз.** Использование *n*-нитроанилидных субстра-

тов для определения класса секретируемых пептидаз штаммов G-192 и P-156 выявило присутствие субтилизин-подобной пептидазы (по субстрату GlpAALpNa) и аминопептидазы (по субстрату LpNa) (рис. 1). Оба штамма проявили наибольшую активность в отношении субстрата, специфичного для аминопептидаз – LpNa. Высокая активность по этому субстрату приходилась на экспоненциальную фазу роста бактерий (48–96 ч) и к 192 ч роста активность заметно снижалась.

Из рис. 1 видно, что максимальная активность пептидазы штамма G-192, наблюдалась на 72 ч культивирования и составляла 91 U/мл при определении с субстратом LpNa. У пептидаз штамма P-156 уровень активности по тому же субстрату был максимальным на вторые сутки и составил 94.8 U/мл. При использовании в качестве субстрата GlpAALpNa для субтилизин-подобных пептидаз определяемые активности были значительно ниже. Изученные штаммы не гидролизировали субстраты, специфичные для химотрипсин-подобных, трипсин-подобных и цистеиновых пептидаз.

Способность изученных бактерий секретировать пептидазы, активные на синтетических субстратах LpNa и GlpAALpNa, возможно, указывает на способность в выработке определенных типов внеклеточных протеолитических ферментов в ответ на конкретные условия окружающей среды. Причиной, вероятно, может быть специфическая ниша обитания.

**Очистка аминопептидаз.** Поскольку аминопептидазы обоих штаммов показали более высокую активность по сравнению с субтилизин-подобными ферментами, они были частично очищены с целью дальнейшего описания их свойств (табл. 1). В процессе очистки были получены аминопептидазы со степенью очистки 4.7, выходом 2.3% и удельной активностью 96.4 U/мг для штамма G-192 и со степенью очистки 9.7, выходом 1.8% и удельной активностью 109.7 U/мг для штамма P-156. Аналогичная хроматографическая процедура была при-

**Таблица 1.** Очистка щелочных аминопептидаз штаммов G-192 (1) и P-156 (2)\*

Стадия очистки	V, мл		Активность, U/мл		Белок, мг/мл		Удельная активность, U/мг белка		Выход, %		Степень очистки	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Культуральная жидкость	50	50	40.7	19.9	2.0	1.8	20.7	11.3	100	100	1	1
Осаждение сульфатом аммония (60%)	5	4	96.2	28.5	3.1	2.2	30.9	13.2	23.6	11.5	1.5	1.17
Ионообменная хроматография (Моно Q)	4	–	9.8	–	0.2	–	46.7	–	1.9	–	2.3	–
Гель-хроматография (Superdex75)	3	5	16.0	3.62	0.2	0.03	96.4	109.7	2.3	1.8	4.7	9.7

\* Очистка на колонке с Моно Q для штамма P-156 не проводили.

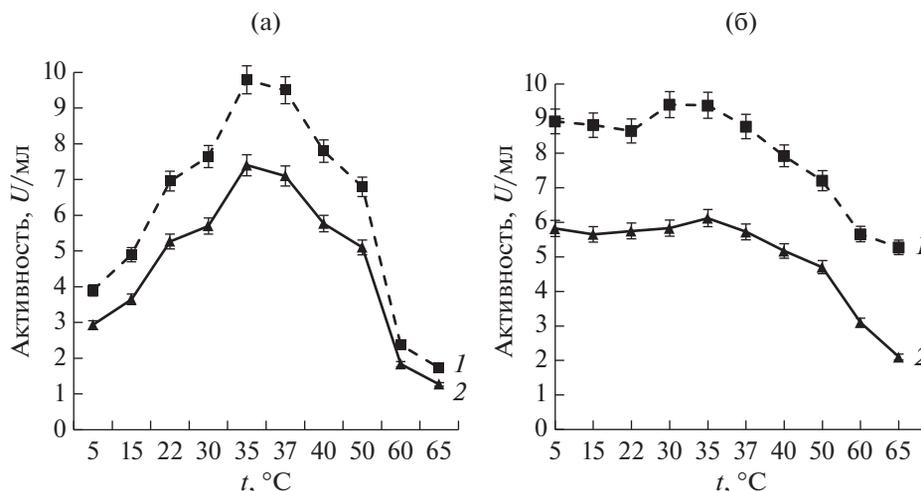


Рис. 2. Температурный оптимум (а) и термостабильность (б) пептидаз штаммов G-192 (1) и P-156 (2).

менена для пептидаз из *Bacillus subtilis* AU-2 [17], алкалофильного штамма *Salipaludibacillus agaradhaerens* AK-R [18], *Staphylococcus sciuri* [19], штамма *Aeribacillus pallidus* C10 [20], галотолерантного штамма *Salinicoccus* sp. UN-12 [21].

**Физико-химические свойства выделенных пептидаз.** Изучение физико-химических свойств ферментов было проведено с использованием синтетического субстрата для пептидаз LpNa на очищенных препаратах штаммов G-192 и P-156.

Определение температурного оптимума и термостабильности пептидаз у изученных штаммов проводили в диапазоне температур 5–65°C (рис. 2). Показано, что температурный оптимум активности пептидаз находился в пределах 30–50°C, с максимумом при температуре 35–37°C. Изученные ферменты были стабильны до температуры 50°C, повышение температуры до 65°C приводит к снижению активности у штамма G-192 до 56% и у штамма P-156 до 34% от исходной активности.

Полученные нами результаты сопоставимы с активностью и стабильностью внеклеточной металлопептидазы морской бактерии *Vibrio* sp. LA-05 [5], которая, как показано, была активна и стабильна при 25–40°C.

Известно, что температурный оптимум и термостабильность пептидаз варьируют в зависимости от вида бактерий. В ранее проведенных исследованиях сообщалось, что щелочные сериновые пептидазы бактерий *Salipaludibacillus agaradhaerens* AK-R и *Bacillus caseinilyticus* SP<sup>T</sup>, выделенных из щелочных озер Индии и Египта, имеют более высокий температурный оптимум – 60°C [18, 22]. Термостабильность пептидазы у штамма *Salipaludibacillus agaradhaerens* AK-R сохранялась при более низких температурах 40–45°C.

Исследования pH оптимума ферментов были проведены в диапазоне pH 2.5–11.5. Установлено, что пептидазы активны в широком диапазоне значений pH, при этом наибольшая активность наблюдалась при pH от 8.4 до 11.0 (рис. 3) и следовательно, они могли быть отнесены к классу щелочных пептидаз. Пептидаза штамма G-192 проявляла максимальную активность при pH 9.0, тогда как пептидаза штамма P-156 при 10.1. Обычно коммерческие микробные пептидазы имеют оптимумы при pH от 7 до 11, хотя оптимумы могут различаться в зависимости от использованных субстратов [23].

Анализ pH-стабильности пептидаз показал, что обе исследуемые аминопептидазы стабильны в широком диапазоне pH от 4.5 до 11.5. При щелочном pH (11.5) пептидаза штамма G-192 сохраняла более 51% от исходной активности, а пептидаза штамма P-156 – 67.5% активности.

Следует отметить, что изученные нами пептидазы имели более широкий диапазон pH-стабильности от 4.5 до 11.5, чем ранее изученные пептидазы бактерий [20].

Влияние хлорида натрия на активность аминопептидаз представлено на рис. 4. Для фермента штамма G-192 установлено, что аминопептидаза была высокостабильной в широком диапазоне концентраций NaCl от 10 до 220 г/л. При этом при концентрации NaCl 270 г/л фермент сохранял 45% от максимальной активности. Аминопептидаза штамма P-156 была стабильной при концентрации NaCl от 10 до 70 г/л, тогда как при 90 г/л активность фермента снижалась в два раза.

Галотолерантность пептидаз является важной характеристикой, поскольку NaCl входит в состав ядра, используемого в процессе грануляции пептидазы перед ее включением в качестве добавки в состав моющего средства [24]. Способность со-

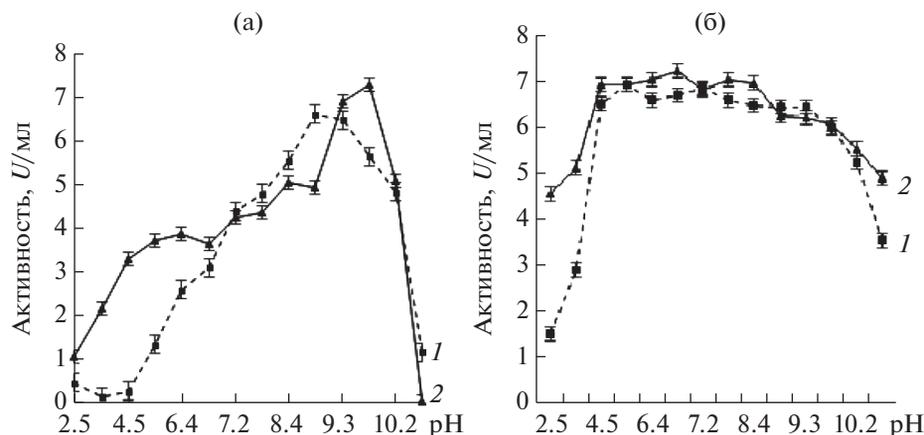


Рис. 3. pH оптимум (а) и pH-стабильность (б) пептидаз у штаммов G-192 (1) и P-156 (2).

хранять активность в условиях высоких концентраций солей очищенных пептидаз делает их многообещающими для использования в качестве экологичной, биологически активной и стабильной добавки в составе детергентов.

Таким образом, определение физико-химических свойств ферментов из штаммов G-192 и P-156 показало, что исследуемые аминопептидазы имели высокую активность и стабильность в широком диапазоне pH (от 4.5 до 11.5) и температуры (5–60°C), а также демонстрировали устойчивость в растворах с высоким содержанием соли (до 220 г/л).

**Определение влияния ингибиторов на активность пептидаз.** Ингибиторный анализ показал, что активности пептидаз штаммов G-192 и P-156 по субстрату LpNa ингибируются ЭДТА – специфическим ингибитором металлопептидаз, тогда как специфические ингибиторы сериновых пептидаз (ФМСФ) и цистеиновых пептидаз (ЙАА) подавляли активность в заметно меньшей степени (табл. 2). Таким образом, по типу ингибирования

выделенные пептидазы можно отнести к классу металлопептидаз.

**Влияние поверхностно-активных веществ и окисляющего агента на стабильность щелочных пептидаз.**

Поверхностно-активные вещества, окислители и ферменты являются важными компонентами современных моющих средств. Существует широкий спектр анионных, неионных, катионных и амфотерных поверхностно-активных веществ и окислителей, которые используются в составе детергентов [25]. Обычно в их составе используются смесь от двух до четырех ПАВ. Преобладающим типом являются анионные ПАВ (например, ДДС-Na), за которыми следуют неионные (тритон X-100). Комбинация анионных и неионных ПАВ позволяет в значительной степени преодолеть вредное воздействие анионных ПАВ на конформацию ферментов. На активность фермента также может влиять концентрация используемых ПАВ и этот эффект проявляется по-разному для разных классов ферментов [26]. Для возможного применения щелочных пептидаз в составе моющих средств они должны функционировать и быть стабильными в различных химически агрессивных условиях.

Влияние некоторых ПАВ на стабильность пептидаз штаммов G-192 и P-156 изучали путем предварительной инкубации фермента с химическими добавками различной концентрации. Показано, что в присутствии тритон X-100 в концентрации от 0.5 до 4.5% остаточная активность пептидаз была 30–45% (табл. 3). Щелочные пептидазы штамма G-192 сохраняли до 50% активности в присутствии сильного анионного ПАВ ДДС-Na при его концентрации от 0.1 до 0.6%. Пептидаза штамма P-156 сохраняла активность на 47% при концентрации ДДС-Na 0.5%. В присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3.0%) используемого для отбеливания, пептидаза штамма G-192 сохраняла 50% активности, тогда как у пептидазы штамма P-156 остаточная активность со-

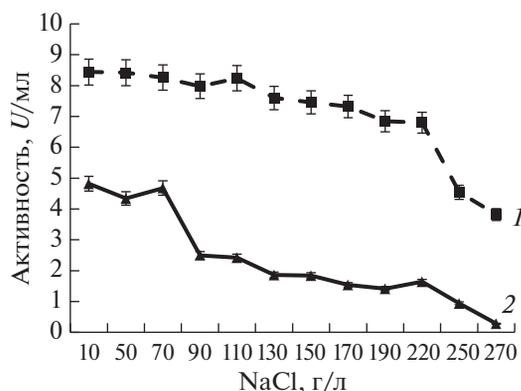


Рис. 4. Активность внеклеточных пептидаз штаммов G-192 (1) и P-156 (2) при различных концентрациях NaCl.

**Таблица 2.** Влияние ингибиторов на активность аминопептидаз

Ингибиторы	Концентрация, М	Остаточная активность пептидаз штаммов, %	
		G-192 <sup>T</sup>	P-156
Контроль	—	100	100
ЭДТА	0.04	46.9	44.8
ЙАА	0.04	78.8	68.4
ФМСФ	0.04	84.8	73.5

ставила 20%. Ингибирование активности от 20 до 50% некоторых щелочных пептидаз у алкалофилов в присутствии 1–5% детергента тритон X-100 описано в работах [20, 21]. Следует отметить, что

**Таблица 3.** Влияние поверхностно-активных веществ и окислителя на активность аминопептидаз из штаммов G-192 и P-156

Реагент	Остаточная активность, % (вес/об.)*	
	G-192	P-156
Тритон X-100, %		
0.5	39.4 ± 1.5	41.5 ± 1.7
1	43.2 ± 1.3	43.5 ± 1.5
1.5	43.1 ± 1.7	45.7 ± 1.9
2	34.9 ± 0.9	40.2 ± 2.1
2.5	33 ± 2.0	41.2 ± 0.6
3	30 ± 1.9	40.7 ± 1.5
3.5	29.4 ± 1.3	42.7 ± 0.7
4	15.2 ± 0.7	42.5 ± 1.3
4.5	6.5 ± 1.8	38.4 ± 0.9
5	5 ± 1.5	12.8 ± 1.7
5.5	6.4 ± 0.9	14.1 ± 2.0
6	4.8 ± 1.7	8.5 ± 1.3
ДДС, %		
0.1	74.5 ± 0.6	88.1 ± 1.1
0.2	62.2 ± 0.8	90.1 ± 1.6
0.3	58.4 ± 1.1	78.7 ± 2.1
0.4	55.7 ± 1.6	78.1 ± 0.6
0.5	52.6 ± 2.2	46.6 ± 0.4
0.6	50.8 ± 0.8	38.2 ± 0.7
0.7	22.9 ± 1.6	38.5 ± 1.1
0.8	23.5 ± 0.6	36.5 ± 0.8
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , %		
0.5	69.8 ± 0.9	80.4 ± 0.4
1.0	54.5 ± 1.4	57.6 ± 1.7
2.0	52.8 ± 1.3	32.2 ± 0.9
3.0	51.8 ± 0.7	19.8 ± 1.3

\* За 100% принимали активность в контроле.

в некоторых работах показана стимуляция протеолитической активности фермента при инкубации его в тритон X-100 в концентрациях 0.1, 1.0 и 5.0% [18, 19, 27]. Подавление активности ферментов на 20–50% в присутствии малых концентраций ДДС-Na описано также и в работах [18, 19]. Полученные результаты свидетельствуют о влиянии отдельных ПАВ на стабильность пептидазы, что в дальнейшем должно быть учтено при разработке моющих средств с оптимальными характеристиками.

Таким образом, было подтверждено, что одним из потенциальных источников щелочных пептидаз могут быть новые алкалофильные бактерии, способные расти в щелочных условиях. Секретируемые пептидазы новых видов алкалофильных бактерий были частично очищены и охарактеризованы. Пептидазы продемонстрировали такие свойства, как высокую стабильность при щелочных pH, устойчивость к ПАВ и солёности среды, что указывало на возможность их использования в качестве добавок при разработке моющих средств.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-04-00236, частично в рамках госзадания АААА-А19-119020590109-3 для ФИЦ Биотехнологии РАН и частично в рамках госзадания 0271-2021-0003 (FWSM-2021-0003) для ФГБУН ИОЭБ СО РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luo L., Meng H., Gu J.-D. // J. Environ. Manage. 2017. V. 197. P. 539–549.
2. Ibrahim A.S.S., Al-Salamah A.A., El-Badawi Y.B., El-Tayeb M.A., Antranikian G // Extremophiles. 2015. V. 19. № 5. P. 961–971.
3. Garg S.K., Singh K.S. // Enz. Eng. 2015. V. 4. № 2. Art. 129.  
<https://doi.org/10.4172/2329-6674.1000129>
4. Sharma M., Gat Y., Arya S., Kumar V., Panghal A., Kumar A.A // Ind. Biotechnol. 2019. V. 15. № 2. P. 69–78.
5. Zhang H., Li H., Lang D.A., Xu H., Zhu H. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2018. V. 93. P. 3627–3637.
6. Zhou, C., Qin, H., Chen X., Zhang Y., Xue Y., Ma Y. // Sci Rep. 2018. V. 8. Art. 16467.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-34416-5>
7. Uma G., Babu M.M., Prakash V.S.G., Nisha S.J., Citarasu T. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 36

- № 5. Art. 66.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-020-02841-2>
8. Danilova I., Sharipova M. // Front Microbiol. 2020. V. 11. P. 1782.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782>
  9. Gessesse A., Gashe B.A. // Biotechnol. Lett. 1997. V. 19. P. 479–481.
  10. Nilegaonkar S., Kanekar P., Sarnaik S., Kelkar A.S. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 18. P. 785–789.
  11. Karan R., Singh S.P., Kapoor S., Khare S.K. // N Biotechnol. 2011. V. 28. № 2. P. 136–145.
  12. Ibrahim A.S., Al-Salamah A.A., El-Badawi Y.B., El-Tayeb Mohamed A., Ibrahim S.S. // Biosci. J. 2016. V. 32. № 6. P. 1604–1618.
  13. Rathod M.G., Pathak A.P. // Data in Brief. 2016. V. 8. P. 863–866.
  14. Abdel-Hamed A.R., Abo-Elmatty D.M., Wiegel J., Mesbah N.M. // Extremophiles. 2016. V. 20. P. 885–894.
  15. Kevbrin V., Boltyanskaya Y., Koziaeva V., Uzun M., Grouzdev D. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2021. V. 71. № 1.  
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004614>
  16. Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W. // Arch. Biochem. Biophys. 1961. V. 95. № 2. P. 271–278.
  17. Patel A.R., Mokashe N.U., Chaudhari D.S., Jadhav A.G., Patil U.K. // Biocatal. Agric. Biotechnol. 2019. V. 19. P. 101–122.
  18. Ibrahim A.S.S., Elbadawi Y.B., Tayeb M.A.E., Maary K.S.A., Maany D.A.F., Ibrahim S.S.S., Elagib A.A. // 3 Biotech. 2019. V. 9. № 11. P. 391.
  19. Abu-Khudir R., Salem M.M., Allam N.G., Ali E.M.M. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2019. V. 189. № 1. P. 87–102.
  20. Yildirim V., Baltaci M.O., Ozgencli I., Sisecioglu M., Adiguzel A., Adiguzel G. // J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2017. V. 32. № 1. P. 468–477.
  21. Mokashe N., Chaudhari B., Patil U. // J. Surfactants Deterg. 2017. V. 20. № 6. P. 1377–1393.
  22. Mothe T., Sultanpuram V. // 3 Biotech. 2016. V. 6. № 53.  
<https://doi.org/10.1007/s13205-016-0377-y>
  23. Gupta R., Beg Q., Lorenz P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 59. P. 15–32.
  24. Jaouadi N.Z., Jaouadi B., Aghajari N., Bejar S. // Process Biochem. 2012. V. 105. P. 142–151.
  25. Hellmuth H., Dreja M. // Tenside Surfactants Deterg. 2016. V. 53. P. 502–508.
  26. Holmberg K. // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2018. V. 168. P. 169–177.
  27. Shaikh I.K., Dixit P.P., Shaikh T.M. // J. Genet. Eng. Biotechnol. 2018. V. 16. № 2. P. 273–279.

## Extracellular Highly Stable Alkaline Peptidases of Alkaliphilic Bacteria *Alkalicaulis satelles* G-192T and *Aliidiomarina* sp. P-156 and Their Possible Use in the Composition of Detergents

E. V. Lavrentyeva<sup>a, b, \*</sup>, E. B. Erdyneeva<sup>a</sup>, Ya. E. Dunaevskii<sup>c</sup>, Yu. V. Boltyanskaya<sup>d</sup>, and V. V. Kevbrin<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, 670047 Russia

<sup>b</sup> Banzarov Buryat State University, Ulan Ude, 670000 Russia

<sup>c</sup> Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>d</sup> Winogradsky institute of microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

\*e-mail: lena\_l@mail.ru

Peptidase activity of alkaliphilic aerobic proteolytic bacteria *Alkalicaulis satelles* G-192T and *Aliidiomarina* sp. P-156, isolated from the system of hypersaline alkaline lakes Tanatar (Altai Territory) was studied. Strains G-192 and P-156 710 were shown to hydrolyze *para*-nitroanilide substrates, exhibiting the highest activity hydrolyzing of the aminopeptidase LpNa substrate. Analysis of partially purified peptidase preparations showed that the enzymes were most active and stable in the alkaline pH range from 8.4 to 11. The peptidases of strains G-192 and P-156 were highly stable in NaCl up to 220 and 70 g/L respectively. The results on inhibitor analysis and substrate specificity of the studied extracellular enzymes suggested their classification as metallopeptidases of the aminopeptidase type. The studied peptidases showed significant resistance to the surfactants Triton X-100, SDS and the oxidizing agent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The isolated bacteria that produce peptidases can be used as a source of proteolytic enzymes in the development of new detergents.

**Keywords:** alkaliphilic bacteria, stable alkaline peptidases, biotechnological potential, detergents