



УДК 577.152.34'1

## ТИОЛЗАВИСИМЫЕ СЕРИНОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ

II\*. ВНЕКЛЕТОЧНАЯ СЕРИНОВАЯ ПРОТЕИНАЗА *BACILLUS CEREUS*

Честухина Г. Г., Епремян А. С., Гайда А. В.,  
Остерман А. Л., Ходова О. М., Степанов В. М.

Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции  
промышленных микроорганизмов, Москва

Аффинной хроматографией на бациллихин—силохроме, бацитрацин—сефарозе в сочетании с гель-фильтрацией на сефадексе G-25 из культуральной жидкости *Bacillus cereus* с выходом 54% выделена чистая внеклеточная сериновая протеиназа, содержащая в дополнение к обычным компонентам активного центра сериновых протеиназ функционально важную сульфгидрильную группу. Молекулярная масса фермента равна 29 000, изоэлектрическая точка лежит выше pH 8,5, аминокислотный состав: Cys<sup>1</sup>, Met<sup>1</sup>, Asp<sup>31</sup>, Thr<sup>20</sup>, Ser<sup>32</sup>, Glu<sup>26</sup>, Pro<sup>11</sup>, Gly<sup>34</sup>, Ala<sup>33</sup>, Val<sup>21</sup>, Ile<sup>14</sup>, Leu<sup>12</sup>, Tyr<sup>14</sup>, Phe<sup>1-2</sup>, His<sup>6</sup>, Lys<sup>12</sup>, Arg<sup>5</sup>, Trp<sup>5</sup>. Оптимум активности фермента по расщеплению специфического субстрата сериновых протеиназ — *n*-нитроанилида бензилкарбонил-*L*-аланил-*L*-лейцина — при pH 8,5. Фермент полностью инактивируется обычными ингибиторами сериновых протеиназ — дипропилфторфосфатом и фенилметилсульфонилфторидом, а также реагентами на сульфгидрильную группу — *n*-хлормеркурибензоатом и ионами ртути.

Внеклеточная сериновая протеиназа по своим свойствам, в частности по аминоконцевой последовательности (Trp-Thr-Pro-Asn-Asp-Pro-Tyr-Tyr-Lys-Asn), очень близка к тиолзависимой сериновой протеиназе *Bacillus thuringiensis* и в несколько меньшей степени — к тиолзависимой протеиназе термоактиномицета *Thermoactinomyces vulgaris*. Эти ферменты, а также сериновая протеиназа из *Streptomyces rectus* и протеиназа В дрожжей, по-видимому, образуют особое подсемейство в рамках семейства субтилизинов.

Ранее нами было показано, что внеклеточные сериновые протеиназы одного из видов бацилл — *Bacillus thuringiensis* — и термоактиномицета — *Thermoactinomyces vulgaris*, относящиеся к хорошо изученному семейству сериновых протеиназ микроорганизмов — субтилизином, необычно близки друг другу по целому ряду структурных и функциональных характеристик [1]. Наиболее своеобразной особенностью этих ферментов является то, что наряду с компонентами активного центра, присущими всем сериновым протеиназам, они содержат сульфгидрильную группу, существенную для активности. Вместе с тем их аминоконцевые последовательности отчетливо гомологичны и обнаруживают гораздо большее сходство между этими ферментами, чем между каждым из них и субтилизинами. Они очень похожи по аминокислотному составу и молекулярному весу, характеру действия на субстраты. Эти наблюдения привели к выводу о принадлежности обеих протеиназ к особому подсемейству тиолзависимых сериновых протеиназ. Анализ литературных данных позволяет предполагать, что это подсемейство может быть достаточно обширным. Так, к нему, по-видимому, могут быть отнесены внеклеточная сериновая протеиназа актиномицета — *Streptomyces rectus* [2] и внутриклеточная сериновая протеиназа В дрожжей [3], хотя относительно последних ферментов нет пока никаких данных, хотя бы об элементах первичной структуры.

Заметим, что присутствие функционально важной сульфгидрильной группы в дополнение к обычным признакам сериновых ферментов свойственно ряду карбоксипептидаз, в частности карбоксипептидазе Y дрожжей [4] и карбоксипептидазам *Aspergillus oryzae* [5, 6]. Впрочем, такое сходство в наборе реакционноспособных групп активного центра не обя-

\* См. работу [1].

Очистка внеклеточной сериновой протеиназы *B. cereus* по схеме I

Стадии очистки	Белок, OF <sub>280</sub>	Суммарная активность, ед. акт.	Уд. акт., ед. акт./OF <sub>280</sub>	Степень очистки	Выход, %
Культуральная жидкость после отделения клеток	10080	3095	0,307	1	100
Высаливание (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> до 85%-ного насыщения	1320	2072	1,57	5	67
Хроматография на DEAE-сефадексе А-25	351	1709	4,87	16	55
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	79	1501	19	62	49
Хроматография на фенолборват-сефарозе 4В	6,4	960	150	489	31

зательно отражает общность структуры и эволюционного происхождения тиолзависимых сериновых эндо- и экзопептидаз.

Несмотря на достаточно подробную изученность протеиназ, секретлируемых бациллами, до последнего времени среди них не обнаруживали тиолзависимых сериновых ферментов. *B. thuringiensis* оказался первым видом, для которого показан синтез такого фермента [4, 7]. Обнаружение сходной тиолзависимой сериновой протеиназы у таксономически отдаленного вида *Tha. vulgaris* [8, 9] делало интересным поиск ферментов данного типа у других видов бацилл, прежде всего у видов, родственных *B. thuringiensis*.

Изучение гибридизации ДНК [10—12], а также ряда особенностей метаболизма и строения эндоспор [13] показывает, что *B. thuringiensis* родственны *B. cereus*, *Bacillus anthracis* и некоторым штаммам *Bacillus megaterium*. У исследованных нами штаммов *B. megaterium* протеолитическая активность, тестируемая по расщеплению специфического субстрата сериновых протеиназ, близких субтилизину [14], не была обнаружена. В то же время один из имевшихся в нашем распоряжении штаммов *B. cereus* (шт. JP-7) продуцировал фермент с достаточно большой активностью по этому субстрату. Данная работа посвящена выделению и характеристике внеклеточной тиолзависимой сериновой протеиназы *B. cereus* и ее сравнению с ранее исследованными ферментами такого же типа. В литературе нет сведений о выделении и свойствах внеклеточной сериновой протеиназы *B. cereus*.

Для выделения внеклеточной сериновой протеиназы *B. cereus* были использованы две схемы. Согласно схеме I (табл. 1), фермент выделяли из культуральной жидкости высаливанием при 85%-ном насыщении сульфатом аммония. Далее проводили отделение фермента, обладающего высокой изоэлектрической точкой, от более кислых белков хроматографией на DEAE-сефадексе А-25, который при pH 6,8 протеиназу не задерживает. Завершающей стадией очистки фермента явилась аффинная хроматография на фенолборонат — сефарозе 4В — сорбенте, избирательно связывающем сериновые протеиназы, который ранее успешно применялся при очистке сериновой протеиназы *Bacillus licheniformis* [15], субтилизина 72 [16], субтилизина ВРН', трипсина и химотрипсина, а также тиолзависимых сериновых протеиназ *Tha. vulgaris* [8] и *B. thuringiensis* [7]. Описанная схема позволила получить чистый фермент, однако ее недостатком было применение сульфата аммония для выделения фермента из культуральной жидкости — длительная операция, особенно трудоемкая в укрупненных опытах.

В усовершенствованной схеме II (табл. 2) мы применили на двух стадиях аффинную хроматографию как эффективный и избирательный метод выделения и очистки фермента. Выделение фермента непосредственно из культуральной жидкости проводили сорбцией на специфическом сорбен-

Учистка внеклеточной сериновой протеиназы *B. cereus* по схеме II

Стадии очистки	Белок, ОЕ <sub>280</sub>	Суммарная активность, ед. акт.	Уд. акт., ед. акт./ /ОЕ <sub>280</sub>	Степень очистки	Выход, %
Культуральная жидкость после отделения клеток	102 000	28 200	0,276	1	100
Хроматография на бациллихин-силохроме	1500	21 000	14	51	75
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	345	15 500	45	163	56
Хроматография на бацитрадин-сефарозе	95	15 100	150	551	54

те — бациллихин—силохроме [17], который обладает большой скоростью потока (это дает возможность быстро обрабатывать большие объемы), не пабухает, устойчив к действию ферментов и микробиологическим загрязнениям.

При выделении сериновой протеиназы *B. cereus* сорбция на бациллихин—силохроме позволяла достичь за одну стадию примерно такой же степени очистки, для которой по первоначальной схеме требовались три стадии (табл. 1). Очистка фермента составила 51 раз при выходе 75%. Последующую гель-фильтрацию на сефадексе G-25 проводили в 0,2 М хлористом натрии и 0,01 М аммоний-ацетатном буфере, pH 6,8. Использование относительно высокой концентрации соли на данной стадии очистки было вызвано необходимостью противодействовать очень легкой сорбируемости катионного фермента на сефадексе. Эта операция позволила освободиться от большей части пигментов и некоторых других низкомолекулярных примесей. Заключительная стадия, аффинная хроматография на бацитрадин—сефарозе [18], привела к чистому ферменту с уд. акт. 150 ед. акт./мг, что отвечает 550-кратной очистке, причем общий выход фермента составил 54% вместо 31% по схеме I.

Для контроля гомогенности полученного препарата был применен электрофорез в полиакриламидном геле при pH разделения 6,5. Данная электрофоретическая система оказалась удобной для исследования тиолзависимых сериновых протеиназ, поскольку высокие значения их изоэлектрических точек (8,5—9) делают малоприменимыми такие методы, как электрофорез в трис-глициновой системе буферов с pH разделения около 9,5 или изоэлектрофокусирование в градиенте pH.

Как показано на рис. 1, препараты внеклеточных сериновых протеиназ *B. cereus* и *B. thuringiensis*, которые дают одну белковую полосу с малой подвижностью ( $R_f \sim 0,1$ ), при pH 9,5 обнаруживают микрогетерогенность в результате электрофореза при pH 6,5.

В препарате сериновой протеиназы *B. cereus* содержатся два компонента, дающие белковые полосы примерно одинаковой интенсивности и одинаково активные по синтетическому субстрату. В препарате же протеиназы *B. thuringiensis* помимо главного компонента содержатся два мипорных, обладающих меньшей подвижностью к катоду при pH 6,5, но также активных по отношению к синтетическому пептидному субстрату. Поскольку протеиназы *B. cereus* и *B. thuringiensis*, несмотря на микрогетерогенность, обнаруживают при определении автоматическим методом Эдмана единственную аминокислотную последовательность, можно предположить, что зоны, обладающие меньшей подвижностью к катоду, обязаны своим образованием частичному дезамидированию остатков глутамина или аспарагина в этих ферментах [19]. Две молекулярные формы, отличающиеся друг от друга числом амидных групп, найдены ранее японскими авторами в тиолзависимой сериновой протеиназе *Str. rectus* [2] — ферменте, химически близком сериновой протеиназе *Tha. vulgaris* и, следовательно, тиолзависимым ферментам *B. thuringiensis* и *B. cereus*. Частичным дезамидированием объясняется и образование множественных молекулярных форм субтилизина [19].



Рис. 1

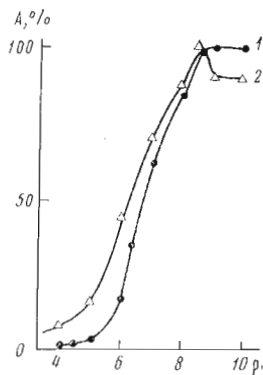


Рис. 2

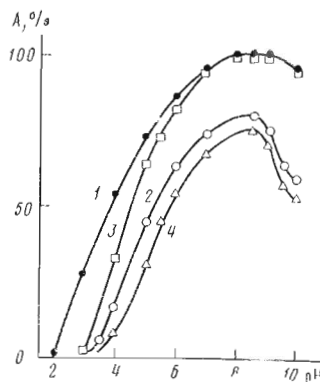


Рис. 3

Рис. 1. Электрофорез при pH разделения 6,5 очищенных препаратов сериновых протеиназ *B. cereus* (1), *B. thuringiensis* (2) и *Tha. vulgaris* (3)

Рис. 2. pH-Оптимум активности внеклеточных сериновых протеиназ *B. cereus* (1) и *B. thuringiensis* (2) по гидролизу *n*-нитроанилида бензилоксикарбонил-*L*-аланил-*L*-аланил-*L*-лейцина

Рис. 3. Зависимость устойчивости внеклеточных сериновых протеиназ *B. cereus* и *B. thuringiensis* от pH при инкубации протеиназы *B. thuringiensis* при 25°С в течение 60 мин (1), 24 ч (2) и инкубации протеиназы *B. cereus* при 25°С в течение 60 мин (3) и 24 ч (4)

Электрофорез в 7% полиакриламидном геле при pH разделения  $\sim 9,5$  показывает для протеиназ *B. cereus* и *B. thuringiensis* только одну белковую зону, обладающую активностью, с  $R_f \sim 0,1$ . Отмеченные выше множественные формы ферментов в данных условиях, по-видимому, не разделяются из-за слишком малой подвижности ферментов.

Молекулярная масса сериновой протеиназы *B. cereus*, определенная электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, равна 29 000, в присутствии катионного детергента цетавлона [20] — 30 000. Гель-фильтрация на сефадексе G-100 приводит к явно заниженной величине молекулярной массы — 19 000. Занижение молекулярной массы, определяемой гель-фильтрацией, характерно для ряда протеиназ и, в частности, отмечалось для тиолзависимой сериновой протеиназы *Tha. vulgaris* и субтилизина [8]. Можно предполагать, что внеклеточные сериновые протеиназы *B. cereus* и *Tha. vulgaris*, будучи ферментами катионного характера, сорбируются на матрице сефадекса G-100, что и вызывает заниженные величины молекулярной массы.

Очевидно, наиболее надежна величина молекулярной массы полипептидной цепи, получаемая электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии детергентов: 29 000—30 000 (величиной 29 000 мы и пользуемся далее в расчетах), данные же гель-фильтрации показывают, что внеклеточная сериновая протеиназа *B. cereus* — мономерный фермент.

Внеклеточная сериновая протеиназа *B. cereus* гидролизует азоказенин, гемоглобин и *n*-нитроанилиды ряда защищенных трипептидов с С-концевыми лейцином или фенилаланином (табл. 3). При этом удельная активность фермента по *Z*-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Leu-NHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub> близка к удельной активности внеклеточной сериновой протеиназы из *B. thuringiensis*.

Ферменты из *B. cereus* и *B. thuringiensis* активны в щелочной зоне и имеют оптимум действия вблизи pH 8,5, далее переходящий в плато (рис. 2). Фермент из *B. cereus* стабилен при pH 5—10, протеиназа из *B. thuringiensis* несколько более устойчива в кислой зоне (рис. 3). При 60°С уже за 10 мин активность ферментов снижается на 60—65%. Температурный оптимум их действия лежит при 45°С. Фермент из *B. cereus* полностью ингибируется фенилметилсульфонилфторидом и диизопропилфторфосфатом — соединениями, блокирующими остаток серина в активном

Удельные активности внеклеточных сериновых протеиназ *B. thuringiensis* (I)  
*B. cereus* (II) по хромогенным пептидным и белковым субстратам и

Субстраты	Удельная активность *		Субстраты	Удельная активность *	
	I	II		I	II
Z-L-Ala-L-Ala-L-Leu-pNA	140	150	Z-Gly-Gly-L-Phe-pNA	1,2	1,4
Z-L-Ala-L-Pro-L-Leu-pNA	0,3	0,24	Z-Gly-L-Pro-L-Leu-	0,1	0,1
Z-L-Ala-L-Ala-L-Phe-pNA	6	7	pNA		
Z-L-Gly-Gly-L-Leu-pNA	0,4	0,5	Гемоглобин	0,1	0,1
			Азоказеин	0,02	0,02

\* Микромоль *n*-нитроанилина/мин на 1 мг белка для пептидных субстратов и ОЕ/мин на 1 мг белка для белковых субстратов.

центре сериновых протеиназ. В то же время эта сериновая протеиназа подобно ферментам из *Tha. vulgaris* и *B. thuringiensis* полностью ингибируется и реагентами на сульфгидрильную группу — *n*-хлормеркурибензоатом или ацетатом ртути.

Как видно из табл. 4, выделенные нами ферменты *B. cereus* и *B. thuringiensis* очень сходны по аминокислотному составу. Небольшие различия наблюдаются лишь в содержании серина и валина. Близки они по аминокислотному составу и к протеиназе из термоактиномицетов. Существенное различие наблюдается в содержании глутаминовой кислоты и лейцина. Все эти ферменты отличаются от секреторных субтилизинапов повышенным содержанием аспарагиновой кислоты и треонина, пониженным — валина, серина, лейцина, метионина и, главное, присутствием цистеина.

Согласно данным аминокислотного анализа, полипептидная цепь внеклеточной сериновой протеиназы *B. cereus* содержит один остаток метионина. В соответствии с этим расщепление ингибированного фенолметилсульфонилфторидом фермента бромцианом дало два пептидных фрагмента, что подтверждено электрофорезом в 10% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и цетавлона. При обоих способах определения молекулярная масса меньшего фрагмента равна 6500—7000. Молекулярная масса второго фрагмента при определении электрофорезом в присутствии додецилсульфата натрия оказалась равной 28 000—29 000, причем

Таблица 4

Аминокислотный состав сериновых протеиназ *B. thuringiensis* (I),  
*B. cereus* (II), *Tha. vulgaris* (III) и субтилизина BPN' (IV)

Аминокислоты	I	II	III [8]	IV [29]
Cys	1	1	1—2	0
Met	1	1	1	5
Asp	33	31	33	28
Thr	21	20	22	13
Ser	27	32	24	37
Glu	24	26	16	15
Pro	12	11	16	14
Gly	32	34	30	33
Ala	37	35	38	37
Val	24	21	20	30
Ile	14	14	14	13
Leu	12	12	8	15
Tyr	15	14	16	10
Phe	3	1—2	4	3
His	5	6	4	6
Lys	11	12	11	11
Arg	6	5	5	2
Trp	5	5	6—7	3
Всего	283	281—282	271	275

Аминоконцевые последовательности сериновых протеиназ *B. thuringiensis* (*B. th.*), *B. cereus* (*B. c.*), *Tha. vulgaris* (*T. v.*) [1], субтилизина BPN' (*B. a.*) [30]

Протеиназа	Аминоконцевая последовательность
<i>T. v.</i>	Tyr-Thr-Pro-Asn-Asp-Pro-Tyr-Phe-Ser- Ser-Arg-Gln-Tyr-Gly-
<i>B. th.</i>	Trp-Thr-Pro-Asn-Asp-Pro-Tyr-Phe-Asn- Asn- -Gln-Tyr-Gly-
<i>B. c.</i>	Trp-Thr-Pro-Asn-Asp-Pro-Tyr-Tyr-Lys*-Asn-
<i>B. a.</i>	Ala-Gln-Ser-Val-Pro-Tyr-Gly- Val-Ser- -Gln-Ile- Lys-

\* Идентификация этого остатка требует дополнительного подтверждения.

Таблица 6

Основные характеристики внеклеточных сериновых протеиназ

Характеристики	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>Tha. vulgaris</i>
Молекулярная масса	29 000	29 000	28 000
pI	>8,5	8,4-8,6	8-9
pH-оптимум активности	8,5	8,5	8,2
Диапазон стабильности	4-10	5-10	7-9
Температурный оптимум активности	45° C	45° C	55° C
Температурная стабильность до обработки реагентами	60° C	60° C	
Остаточная активность после обработки *			
фенилметилсульфонилфторидом	0	0	0
дизопропилфторфосфатом	0	0	0
<i>n</i> -хлормеркурибензоатом	1	2	0
Hg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	0	0	0
EDTA	82	90	100

\* Концентрация реагентов 1 мМ.

этот фрагмент не разделяется с исходным ферментом или субтилизинном. Отделение высокомолекулярного компонента от исходного белка достигается только при электрофорезе в присутствии 0,1% цетавлона. При этом молекулярная масса крупного фрагмента оказалась равной 24 000. Причины аномального поведения высокомолекулярного фрагмента при электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия не вполне ясны. Можно думать, что оно обусловлено более высоким содержанием остатков дикарбоновых аминокислот в этой части молекулы, способным снизить количество присоединяющегося к полипептидной цепи додецилсульфата. Характерно, что в присутствии катионного детергента (цетавлона) эта аномалия не проявляется.

Как уже было показано Хёне с сотр. [9], обработка термитазы — термостабильной протеиназы *Tha. vulgaris* бромцианом также давала два пептида с молекулярными массами 25 000 и 6000.

Кроме очень большого сходства в аминокислотном составе протеиназы из *B. cereus* и *B. thuringiensis* близки к ферменту из *Tha. vulgaris* и по N-концевой аминокислотной последовательности (табл. 5).

Из девяти идентифицированных аминокислотных остатков N-концевого участка протеиназы *B. cereus* семь совпадают с соответствующими остатками фермента из *B. thuringiensis*, причем одна из замен — тирозин-8 вместо фенилаланин-8 — консервативная и шесть с соответствующими остатками протеиназы *Tha. vulgaris*. Число совпадений аминокислот при сравнении с соответствующими участками субтилизина BPN' (2 из 9) настолько мало, что, взятое самое по себе, не позволило бы говорить о сходстве протеиназы *B. cereus* с субтилизинами. Следует отметить, что в некоторых препаратах внеклеточной сериновой протеиназы *B. cereus* кроме

последовательности, приведенной в табл. 5, имеется полипептидная цепь, укороченная на N-концевой остаток триптофана и начинающаяся с треонина.

Таким образом, по молекулярной массе, содержанию функционально важной меркаптогруппы, отношению к ингибиторам, гомологии N-концевых последовательностей, аминокислотному составу, изоточке и другим характеристикам внеклеточной сериновой протеиназы *B. cereus* и *B. thuringiensis* близки к сериновой протеиназе из термоактиномицетов (табл. 6).

По функциональным свойствам вышеуказанные ферменты имеют много общего с субтилизинами [7, 8]. Главное отличие состоит в том, что активность сериновых протеиназ *B. cereus*, *B. thuringiensis* и протеиназы из *Tha. vulgaris*, а также близкой к последней протеазы *Str. rectus* подавляется реагентами на сульфгидрильные группы — *n*-хлормеркурибензоатом и ацетатом ртути. Ингибирование внеклеточной сериновой протеиназы *B. thuringiensis* *n*-хлормеркурибензоатом наблюдалось и ранее [23], однако было отнесено на счет денатурирующего действия ингибитора на белок.

Роль SH-группы в тиолзависимых сериновых протеиназах пока неясна, но неизменное появление остатков цистеина, обладающих сходной реакционной способностью, в нескольких ферментах, образуемых представителями различных таксонов микроорганизмов — термоактиномицетами, бациллами и дрожжами, — указывает на их возможное участие в функционировании этих протеиназ. Обнаружение фермента *B. cereus* — еще одной сериновой протеиназы бацилл, содержащей сульфгидрильную группу, существенную для активности фермента, подтверждает наше предположение о существовании отдельного подсемейства в составе семейства эволюционно родственных субтилизиннов.

### Экспериментальная часть

В работе использовали сефадексы G-25 и G-100, DEAE-сефадекс А-25 (Pharmacia, Швеция); аффинные сорбенты — бацитрацин — сефарозу, фенилборонат — сефарозу и бациллизин — силохром, синтезированные в нашей лаборатории; акриламид, метиленбисакриламид, триоксиметиламинометан, кумасси ярко-голубой R-250 и G-250, фенилметилсульфонилфторид, EDTA, EGTA (Serva, ФРГ); какодилловую кислоту (Schutgardt, ФРГ); азоказеин, NEPES (Sigma, США); тетраметилэтилендиамин, глицин, *L*-гистидин (Reanal ВНР); *n*-хлормеркурибензойную кислоту (Chemapol, СССР); пептон (отечественного производства). Хромогенные пептидные субстраты — *n*-нитроанилиды бензилоксикарбонил-*L*-аланил-*L*-аланил-*L*-лейцина, бензилоксикарбонил-*L*-аланил-*L*-пролил-*L*-лейцина, бензилоксикарбонил-*L*-аланил-*L*-аланил-*L*-фенилаланина, бензилоксикарбонил-глицил-глицил-*L*-лейцина, бензилоксикарбонил-глицил-*L*-пролил-*L*-лейцина — синтезированы в нашей лаборатории Л. А. Люблинской, которой авторы приносят глубокую благодарность.

Выращивание культуры проводили в 30-литровом ферментере в течение 18 ч при 28° С на среде, содержащей 0,5% пептона, 0,5 г/л  $K_2HPO_4$ , 0,2% дрожжевого экстракта, 0,2% глюкозы, 0,003%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,008%  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0,005%  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , pH 7,4. Посевным материалом, который вносили в количестве 10% (по объему), служила 6-часовая культура, выращенная при 28° С в колбах объемом 1 л со 100 мл указанной среды при 120 об/мин. Биомассу отделяли центрифугированием культуральной жидкости в течение 30 мин при 6000 об/мин.

Выделение и очистку фермента проводили по двум схемам.

*Схема I.* К надосадочной жидкости (2,8 л) добавляли сульфат аммония до 85% насыщения. Осадок, сформировавшийся в течение 12 ч при 4° С, отделяли центрифугированием при 12000 об/мин в течение 30 мин и растворяли в 110 мл 0,01 М аммоний-ацетатного буфера, pH 6,8. Полученный раствор фермента (с уд. акт. 1,57 ед. акт./ОЕ) наносили на колонку с DEAE-сефадексом А-25 (5×12 см), уравновешенную тем же буфером.

Активный фермент в отличие от примесей не задерживается на сорбенте и элюируется при промывании исходным буфером. После обессоливания на сефадексе G-25 получили 79 ОЕ белка с уд. акт. 19 ед. акт./ОЕ. К этому раствору прибавляли 0,4 М триэтиламинокарбонатный буфер (ТЭАК), рН 7,4, до конечной концентрации 0,01 М и наносили на колонку с фенилборонат-сефарозой (1,6×10 см), уравновешенную 0,01 М ТЭАК, рН 7,4. После промывки сорбента исходным буфером фермент элюировали 0,5 М трис-НСI-буфером, рН 9. В результате был получен раствор фермента (6,4 ОЕ) с уд. акт. 150 ед. акт./ОЕ. К части раствора (1 ОЕ) прибавляли равный объем глицерина и хранили при -10° С. В дальнейшем этот раствор использовали при исследовании функциональных свойств фермента. Оставшуюся часть раствора фермента (5,4 ОЕ) ингибировали фенилметилсульфонилфторидом, диализовали против дистиллированной воды и лиофильно высушивали.

Схема II. 30 л надосадочной жидкости фильтровали со скоростью 6—7 л/ч через слой 600 мл влажного бацитлихин—силохрома, уравновешенного 0,02 М аммоний-ацетатным буфером, рН 6,8, и помещенного на воронку Бюхнера. Для контроля за сорбцией фермента в пробах элюата определяли протеолитическую активность. После окончания фильтрации сорбент промывали на фильтре 4—6 объемами исходного буфера, переносили в колонку (5×50 см) и элюировали фермент раствором, содержащим 25% изопропилового спирта, 1 М NaCl и 0,01 М ацетат аммония, рН 6,8. Элюат (1500 ОЕ белка в 400 мл раствора) хроматографировали на колонке с сефадексом G-25 (5×80 см), уравновешенным 0,2 М NaCl в 0,01 М ацетате аммония, рН 6,8. Фракцию (345 ОЕ), содержащую фермент, хроматографировали на колонке с бацитрацин—сефарозой (4×4 см), уравновешенной 0,2 М NaCl в 0,01 М аммоний-ацетатном буфере, рН 6,8. После нанесения раствора на колонку и промывки сорбента исходным буфером фермент элюировали 25% раствором изопропилового спирта в 0,01 М аммоний-ацетатном буфере, содержащем 1 М NaCl. Раствор фермента (99,5 ОЕ) ингибировали фенилметилсульфонилфторидом, диализовали против дистиллированной воды и лиофильно высушивали. Количество белка определяли по поглощению при 280 нм на спектрофотометре СФ-16А, а протеолитическую активность — по ранее описанной методике [14] с помощью синтетического хромогенного субстрата *п*-нитроанилида бензил-оксикарбонил-*L*-аланил-*L*-аланил-*L*-лейцина.

Молекулярную массу определяли с помощью электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия и 8 М мочевины [24] или в присутствии 0,1% цетавлона [20]. Препарат протеиназы *B. cereus*, ингибированный фенилметилсульфонилфторидом в целях предупреждения автолиза, перед опытом растворяли в 90% водном феноле, после чего добавляли 10 объемов охлажденного ацетона и выдерживали 30 мин при 4° С. Осадок собирали центрифугированием при 6000 об/мин и промывали 4 раза ацетоном, а затем эфиром. Денатурированный фенолом препарат кипятили 2 мин в 8 М мочеvine, содержащей 1% додецилсульфата натрия и 1% меркаптоэтанола или в растворе 1% цетавлона и 1% меркаптоэтанола.

Электрофорез при рН разделения 9,5 проводили по методу Девиса [25], определяя  $R_f$  белков относительно положения маркера — бромфенолового синего.

Электрофорез при рН разделения 6,5 проводили по разработанной нами методике в вертикальном слое полиакриламидного геля (размеры пластины 175×200×1,5 мм). В качестве верхнего электродного раствора использовали 0,03 М *L*-гистидин — HCl-буфер, рН 6,5. Нижний электродный раствор — 0,03 М какодиловая кислота — КОН, рН 6,5.

Разделяющий гель: 7,5% акриламид, 0,375% метиленбисакриламид, 0,0275% персульфат аммония, 0,2% тетраметиленамин, 0,03 М какодиловая кислота — КОН, рН 6,5. Концентрирующий гель: 3,5% акриламид, 0,175% метиленбисакриламид, 0,025% персульфат аммония, 0,3% тетраэтиленамин, 0,03 М HEPES — КОН, рН 8. В качестве маркера использовали 0,1% раствор метилового зеленого. Время опыта 3,5—4 ч, сила тока



30 мА, напряжение 300 В. После фореа белки окрашивали кумасси ярко-голубым G-250 по методике [21].

Аминокислотный анализ солянокислых гидролизатов белка (105°С, 24, 48 и 72 ч) проводили на аминокислотном анализаторе Durrum 500. Цистеин и метионин определяли в виде цистеиновой кислоты и метионин-сульфона соответственно [22]. Для определения триптофана белок гидролизовали метансульфонокислотой [26]. Авторы благодарны Е. А. Тимохиной за проведение анализа.

Определение N-концевой последовательности молекулы фермента проводили на секвенаторе аминокислот Beckman (США). После каждого цикла фенилтиогидантоины аминокислот идентифицировали газовой хроматографией, тонкослойной хроматографией и аминокислотным анализом [27, 28].

Расщепление фермента бромцианом проводили по методике [9]. 20 ОЕ ингибирующего фенилметилсульфонилфторидом образца протеиназы *B. cereus* растворяли в 2 мл 70% муравьиной кислоты, после чего в раствор вносили 20 мг бромциана и смесь инкубировали 20 ч при 20°С. Далее раствор разбавляли дистиллированной водой до 40 мл и лиофильно высушивали. С целью обнаружения продуктов расщепления и определения их молекулярных масс часть сухого материала исследовали методом электрофореза в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия или 0,1% цетавлона.

Методы, использованные для характеристики выделенного фермента, подробно описаны нами ранее [7].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Stepanov V. M., Chestukhina G. G., Rudenskaya G. N., Epremyan A. S., Osterman A. L., Khodova O. M., Belyanova L. P. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1981, v. 100, № 4, p. 1680-1687.
2. Mizusawa K., Yoshida F. *J. Biol. Chem.*, 1972, v. 247, № 21, p. 6978-6984.
3. Kominami E., Hoffschulte H., Holzer H. *Biochem. et biophys. acta*, 1981, v. 661, № 1, p. 124-135.
4. Hayashi R., Moore S., Stein W. H. *J. Biol. Chem.*, 1973, v. 248, № 24, p. 8366-8369.
5. Nakadaï T., Seichi N., Nobuyoshi I. *Agr. and Biol. Chem.*, 1972, v. 36, p. 1481-1488.
6. Азаренкова Н. М., Ваганова Т. И., Стронгин А. Я., Степанов В. М. *Биохимия*, 1976, т. 41, № 1, с. 20-27.
7. Епремян А. С., Честухина Г. Г., Азизбекия Р. Р., Негыкса Е. М., Руденская Г. Н., Степанов В. М. *Биохимия*, 1981, т. 46, № 5, с. 920-929.
8. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Нестерова П. Г., Гунришнова Т. И., Хохлова Ю. М., Усайте И. А., Логинова Л. Г., Тимохина Е. А. *Биохимия*, 1980, т. 45, № 10, с. 1871-1880.
9. Hausdorf G., Krüger K., Höhne W. E. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1980, v. 15, № 2, p. 420-425.
10. Somerville H. G., Jones M. L. *J. Gen. Microbiology*, 1972, v. 73, № 1, p. 257-265.
11. Kaneko T., Nozaki R., Aizawa K. *Microbiol. and Immunol.*, 1978, v. 22, p. 639-641.
12. Seki T., Chung C.-K., Mikami H., Oshima Y. *Int. J. System. Bacteriol.*, 1978, v. 28, № 1, p. 182-189.
13. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed./Eds Buchanan R. E., Gibbons N. E. Baltimore: Williams and Wilkins Co, 1975.
14. Люблинская Л. А., Якушева Л. Д., Степанов В. М. *Биоорг. химия*, 1977, т. 3, № 2, с. 273-279.
15. Акбаров А. Kh., Stepanov V. M. *J. Chromatogr.*, 1978, v. 155, № 1, p. 329-336.
16. Акбаров В. X., Белянова Л. П., Баратова Л. А., Степанов В. М. *Биохимия*, 1979, т. 44, № 5, с. 886-891.
17. Stepanov V. M., Rudenskaya G. N., Gaida A. V., Osterman A. L. *J. Biochem. and Biophys. Meth.*, 1981, v. 5, № 1, p. 177-186.
18. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Яноус В. В., Острославская В. П., Гончар М. В., Котлова Е. М., Стронгин А. Я. *Биоорг. химия*, 1978, т. 4, № 9, с. 1256-1263.
19. Степанов В. М. *Успехи совр. биологии*, 1982, т. 93, № 1, с. 35-45.
20. Panyin S., Thitiopongranich R., Supatimusro D. *Anal. Biochem.*, 1977, v. 81, № 2, p. 320-327.
21. Holbrook J. B., Leaver A. G. *Anal. Biochem.*, 1976, v. 75, № 2, p. 634-636.
22. Hirs C. H. W. In: *Methods in enzymology*/Eds Colowick S. P., Kaplan N. O. N. Y.: Acad. Press, 1967, v. 11, p. 59-62.
23. Егоров Н. С., Юдина Т. Г., Лория Ж. К., Крейер В. Г. *Бiol. науки*, 1978, т. 177, № 1, с. 99-102.
24. Weber K., Osborn M. *J. Biol. Chem.*, 1969, v. 244, № 16, p. 4406-4412.
25. Davis B. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, v. 121, № 1, p. 404-427.
26. Penke B., Ferenczi R., Kovacs K. *Anal. Biochem.*, 1974, v. 60, № 1, p. 45-50.

27. Hermodson N. A., Ericsson L. H., Titani K., Neuroth H., Walsh K. A. *Biochemistry*, 1972, v. 11, № 24, p. 4493–4502.
28. Pisano J. J., Bronzert T. J., Brewer H. B. *Anal. Biochem.*, 1972, v. 45, № 1, p. 43–59.
29. Matsubara H., Kasper C. B., Brown D. M., Smith E. L. *J. Biol. Chem.*, 1965, v. 240, № 5, p. 1125–1134.
30. Kurihara M., Marhaland F. S., Smith E. L. *J. Biol. Chem.*, v. 247, № 17, p. 5619–5631.

Поступила в редакцию  
19.V.1982

## THIOL-DEPENDENT SERINE PROTEINASES. II. EXTRACELLULAR SERINE PROTEINASE OF *BACILLUS CERENS*

CHESTUKHINA G. G., EPREMYAN A. S., GAIDA A. V.,  
OSTERMAN A. L., KHODOVA O. M., STEPANOV V. M.

*Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow*

Pure extracellular serine proteinase was isolated from *Bacillus cereus* cultural filtrate by successive affinity chromatography on bacilliquine–silochrom and bacitracin–sepharose followed by gel-filtration on Sephadex G-25. This enzymes contains, in addition to usual components of serine proteinase active site, a functionally essential thiol group. The mol. weight of the enzyme is equal to 29 000, *pI* lies higher than 8,5, amino acid composition: Cys<sup>1</sup>, Met<sup>1</sup>, Asp<sup>31</sup>, Thr<sup>20</sup>, Ser<sup>32</sup>, Glu<sup>26</sup>, Pro<sup>11</sup>, Gly<sup>34</sup>, Ala<sup>33</sup>, Val<sup>21</sup>, Ile<sup>14</sup>, Leu<sup>12</sup>, Tyr<sup>14</sup>, Phe<sup>1-2</sup>, His<sup>6</sup>, Lys<sup>12</sup>, Arg<sup>5</sup>, Trp<sup>5</sup>. The activity optimum for benzyloxycarbonyl-*L*-alanine-*L*-alanine-*L*-leucine-*p*-nitroanilide hydrolysis is at pH 8.5. The enzyme is completely inactivated by conventional serine proteinase inhibitors – diisopropylfluorophosphate and phenylmethylsulfonylfluoride, as well as by the reagents for SH group – *p*-chloromercuribenzoate and Hg<sup>2+</sup> ions. Many of the extracellular serine proteinase characteristics, e. g., its N-terminal amino acid sequence (Trp-Thr-Pro-Asn-Asp-Pro-Tyr-Tyr-Lys-Asn) strongly resemble those of thiol-dependent serine proteinase of *Bacillus thuringiensis*, and to the lesser extent the properties of the thiol-dependent serine proteinase from thermoactinomycetes – *Thermoactinomyces vulgaris*. Apparently, these enzymes alongside with proteinase from *Streptomyces rectus* and proteinase B from yeasts form specific subfamily within the family of subtilisins.