

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ АМИДАЗ ПОЧВЕННЫХ АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCLUS*

© 2011 Ю.А. Павлова<sup>1,2</sup>, А.Н. Неустроева<sup>1</sup>, А.Ю. Максимов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Пермский государственный университет, г. Пермь

<sup>2</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь

Поступила 18.07.2011

Исследованы почвенные культуры актинобактерий рода *Rhodococcus*, обладающие термостабильной амидазной активностью. Проведены ПЦР-анализ и секвенирование генов амидаз. Выявлены последовательности, гомологичные известным генам амидаз из *R. erythropolis* (GenBank, M88614), *R. erythropolis* (GenBank, E12517) и *R. rhodochrous* N774.

**Ключевые слова:** актинобактерии, амидаза, секвенирование, *Rhodococcus*.

Амидазы (КФ 3.5.1.4) – ферменты, катализирующие гидролиз амидов с образованием соответствующих карбоновых кислот и аммония. Они найдены у многих прокариот и эукариот. Микроорганизмы, активно использующие амиды и нитрилы в качестве ростового субстрата, обнаружены среди бактерий различных таксономических групп: *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, и др. [0, 0, 0, 0, 0, 0]. Известно, что у прокариот амидазная активность может быть сопряжена с метаболизмом нитрилов в нитрилгидратазно-амидазном пути гидролиза этих соединений, однако амидазы встречаются и у бактерий, не имеющих нитрилгидратазы [0].

Кроме способности к гидролизу амидов амидазы обладают также ацилтрансферазной активностью. Некоторые из этих ферментов проявляют стереоселективность по отношению к хиральным субстратам, например, к производным арилпропионовой кислоты. Бактерии, обладающие высокой амидазной активностью, представляют интерес для биокаталитического получения различных карбоновых кислот, в частности, аммонийных солей акриловой и никотиновой кислот, нестероидных противовоспалительных препаратов [0, 0].

Амидазы, выделенные из различных источников, характеризуются различной субстратной специфичностью [7]. Известные амидазы подразделяются на четыре различные структурные группы [0]: I – сигнатурные ферменты, содержащие в первичной структуре GGSS-мотив (глицин-глицин-серин-серин); II – нитрилазы/цианидгидратазы; III – ацилтрансферазы; IV – уреазы [0]. Установлено, что даже у бактерий одного и того же вида встречаются структурно не родственные амидазы.

Данная работа посвящена исследованию анализу генов стереоселективных амидаз почвенных микроорганизмов, обладающих высокой амидазной активностью.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объекты исследования - выделенные из почв штаммы актинобактерий *Rhodococcus erythropolis* и *R. rhodochrous*, активно трансформирующие амиды карбоновых кислот. Культуры изолировали из почвы методом прямого посева и выращивали на минеральной безазотной солевой среде N, содержащей ацетамид в концентрации 10 мМ. Трансформацию амидов и нитрилов с использованием активной биомассы проводили в 1 мл 10 мМ калий-натрий фосфатного буфера, pH 7.2, при начальной концентрации субстрата 2% параллельно при 25 и 50°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением конц. HCl до концентрации 2%. Пробы центрифугировали 5 мин при 12 тыс об/мин. Продукты реакции анализировали методами ГХ (Shimatzu GC-20) и ВЭЖХ (Shimatzu LC-10A). В качестве стандартов использовали растворы чистых нитрилов, амидов и карбоновых кислот. Удельную активность амидазы выражали единицах (Ед), соответствующих 1 мкмоль продукта реакции (кислоты), образуемого за 1 мин, в пересчете на 1 мг веса сухих клеток (мкмоль/мг/мин). Хромосомную ДНК получали фенольным методом, модифицированным для выделения ДНК из актиноциетов [0]. Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) генов амидаз и секвенирования соответствующих ПЦР-фрагментов были разработаны праймеры, комплементарные концевым участкам известных последовательностей генов амидаз, депонированных в базе данных GenBank (табл. 1). Амплификацию ДНК проводили с применением термостабильной *Taq*-SE ДНК-полимеразы (СибЭнзим, Новосибирск) на термоциклере ТЗ (Biometra, Германия). Режим амплификации включал начальный цикл денатурации – 1 мин при 94°C; денатурацию, 94°C – 40 с; отжиг, 55-63° – 30 с; элонгацию, 72°C – 60 с; (35 циклов) и завершающий этап – 60 с при 72°C. Секвенирование последовательностей ПЦР-фрагментов проводили на приборе MagaBase1000 (GE Healthcare) с использованием стандартных наборов в соответствии с инструкцией производителя. Сравнение последовательностей проводили с помощью программы ClustalW.

Павлова Юлия Андреевна, e-mail: lchm@iegm.ru;  
Неустроева Анна Николаевна, e-mail: lchm@iegm.ru;  
Максимов Александр Юрьевич, канд. биол. наук, e-mail: alm@iegm.ru

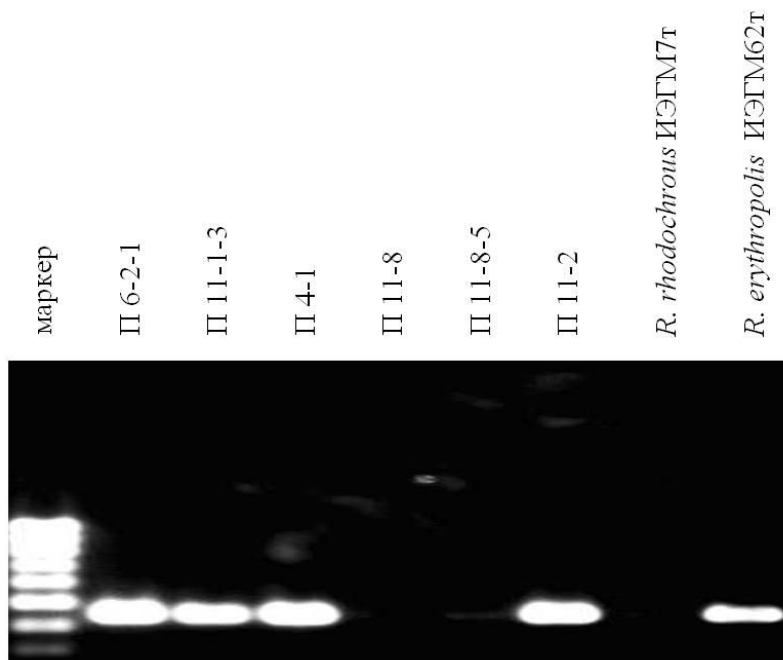
**Таблица 1.** Праймеры для амплификации генов амидазы

Выявляемый тип гена	Праймер	Последовательность
амидаза, гомологичная ферментам из <i>R. erythropolis</i> (E12517) и <i>R. rhodochrous</i> N-774 (X54074)	AmiRhd-1 AmiRhd-2	5'-ATGGCGACAATCCGACCTGACGACA 5'-CTAGGCGGGGCTGAGTTGTGGTGCAGA
амидаза, гомологичная ферменту из <i>R. erythropolis</i> (M88714)	AmiReR-1 AmiReR-2	5'-ATGCGACACGGTGACATCTCCTCGA 5'-TTACGCTTCGACGGTCTTCTCGAC
амидаза, гомологичная ферменту из <i>R. erythropolis</i> (AY026386)	AmiReX-1 AmiReX-2	5'-GTGCGACCCAATCGCCATTCGGCC 5'-CTACCGCAGCACCGGTGCGCTCGG
амидаза, гомологичная ферментам из <i>R. rhodochrous</i> J1 (S38270) <i>Rhodococcus</i> sp. (BD061400)	AmiJ1-1 AmiJ1-2	5'-ATGTCTTCGTTGACTCCCCCAATT 5'-TTATGTCAGGGTGCCGGCTGCAGC
	AmiBD-2	5'-TCAGGACGGCACCGAGGGTCGCGG
амидаза, гомологичная ферменту <i>Rhodococcus</i> sp. (A19131)	AmiRsp-1 AmiRsp-2	5'-ATGGGCTTGCATGAACTGACGCTCG 5'-TCAAAGCGGCGCCAGTCGCGGCCA

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Проведён скрининг образцов подзолистых супесчаных почв, собранных в районах г. Березников, г. Соликамска и г. Перми Пермского края. В результате скрининга нами выделено более 400 культур грамположительных бактерий, активно метаболизирующих амиды и нитрилы, из них 38, обладающих амидазной активностью более 5

мкмоль/мг/мин. Основная часть активных изолятов была представлена актинобактериями, в основном относящимися к роду *Rhodococcus*. Методами полифазной таксономии изоляты идентифицированы как представители рода *Rhodococcus*: *R. erythropolis*, *R. rhodochrous*, *R. ruber* [0]. Их видовая принадлежность была подтверждена методом ПЦР генов 16S рРНК с видоспецифическими праймерами (рис. 1).



**Рис. 1.** Идентификация штаммов *R. erythropolis* по генам 16S РНК. *R. rhodochrous* ИЭГМ7т и *R. erythropolis* ИЭГМ62т – типовые штаммы соответствующих видов.

Показано, что большинство амидаз изолятов *Rhodococcus* высокоактивны при повышенной температуре (50°C), что свидетельствует также об их технологической стабильности и является положительным признаком для биотехнологического применения.

Установлено, что ферменты исследуемых культур способны активно трансформировать большой

ряд амидосоединений, включая алифатические, разветвленные, непредельные, гидроксильные и некоторые ароматические амиды [0]. Наилучшими субстратами для ферментов большинства штаммов являются ацетамид и пропионамид (наиболее простые по структуре и легко метаболизируемые субстраты). Однако некоторые штаммы, селекционированные на изобутиронитриле и изо-

бутирамиде предпочитали именно эти субстраты с пространственно затрудненным доступом к амидной группе. Известно, что штаммы, выделенные методом обогащенной культуры, часто проявляют высокую конвертирующую способность именно к тому субстрату, который использовался для селекции. Никотинамид и бензамид гидролизвались с меньшей скоростью.

В ходе селекционного процесса при постепенном повышении концентрации субстрата (нитрила) выделены культуры *R. erythropolis* 4-1-6, 4-1-6 6-2-1, 11-2, 11-1-3 и *R. rhodochrous* 11-8, 11-85, проявляющие амидазную активность более 12 Ед. при 25°C и более 30 Ед. при 50°C, а также активность нитрилгидратазы более 10°C.

Проведён молекулярный анализ генов амидаз. Показано, что геномы изолятов *Rhodococcus* содержат преимущественно последовательности, родственные ранее известным генам амидаз двух

структурных групп: I – энантиоселективные амидазы, как у *R. erythropolis* (GenBank, E12517), *R. rhodochrous* N-771, (GenBank, X54074) и II – алифатические амидазы, как у *R. erythropolis* (GenBank, M88614).

Гены других видов амидаз встречались со значительно меньшей частотой. Последовательности группы I, были обнаружены у отдельных изолятов *R. erythropolis* и *R. rhodochrous*. Другие культуры тех же видов содержали другие ферменты. Результаты ПЦР-анализа подтвердили, что наличие амидазы определённого типа не является видоспецифическим признаком.

Большинство штаммов также содержали последовательности, родственные генам  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц Fe-содержащей нитрилгидратазы штаммов *R. rhodochrous* N-774, *Rhodococcus* sp. R312.

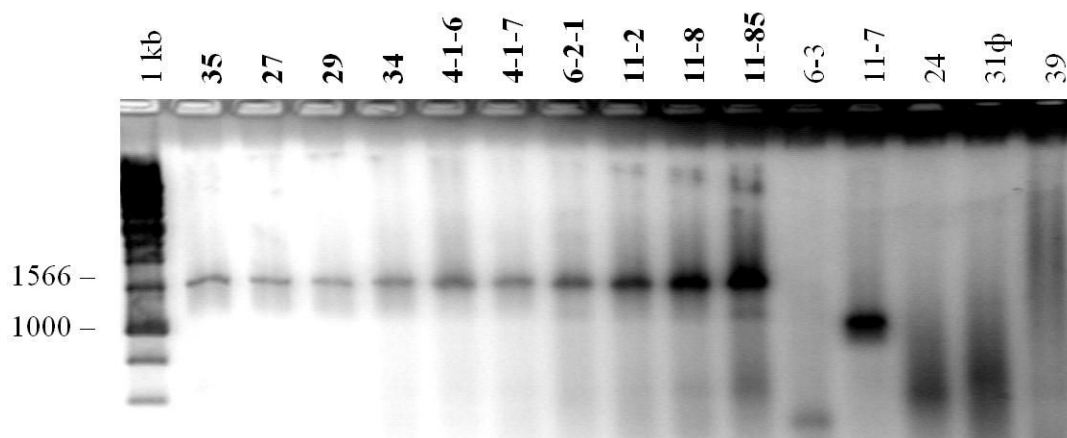


Рис. 2. ПЦР-анализ последовательностей, гомологичных генам амидазы *R. erythropolis*, GenBank, E12517, у почвенных изолятов *Rhodococcus*.

Проведено секвенирование полученных ПЦР-фрагментов с помощью ДНК-секвенирующей системы MegaBase1000. Установлено, что гомоло-

гия исследуемых генов почвенных изолятов известной последовательности E12517 составляет от 97,83 до 100% (табл. 2).

Таблица 2. Процент гомологии генов амидаз группы I

штамм	E12517	4-1-6	4-1-7	11-8	6-2-1	11-1-3/4
<i>R. erythropolis</i> E12517	100,00%	98,40%	99,10%	99,17%	99,23%	98,00%
<i>R. erythropolis</i> 4-1-6		100,00%	99,29%	99,29%	99,17%	97,83%
<i>R. erythropolis</i> 4-1-7			100,00%	100,00%	99,90%	98,53%
<i>R. rhodochrous</i> 11-8				100,00%	99,87%	98,53%
<i>R. erythropolis</i> 6-2-1					100,00%	98,59%
<i>R. erythropolis</i> 11-1-3/4						100,00%

Высокая степень гомологии исследованных последовательностей ДНК из различных источников свидетельствует о высокой консервативности структуры генов и соответствующих ферментов.

При переводе нуклеотидной последовательности в аминокислотную установлено, что у исследуемых штаммов есть ряд нуклеотидных замен по сравнению с ранее известными последовательностями, что, вероятно, обуславливает ранее установ-

ленные различия субстратной специфичности ферментов [0, 0].

Притом сходство соответствующих аминокислотных последовательностей составило от 99,7 до 100%, т.е. ряд замен нуклеотидов являются синонимическими, не приводят к заменам аминокислот (рис. 3).

Таким образом, установлено, что среди культур, обладающих высоким уровнем амидазной активно-

сти, преобладают представители рода *Rhodococcus*. Среди почвенных изолятов *Rhodococcus*, обладающих высокой амидазной активностью, наиболее распространены гены амидаз двух типов, гомологичные последовательностям из *R. erythropolis*, GenBank, E12517 и *R. erythropolis*, GenBank, M88614. Гены ранее известного структурного типа энантиоселективных амидаз гомологичных последо-

вательности E12517, широко представлены у родококков, обитающих в почве естественной среды. Показано, что гены исследуемого структурного типа амидаз встречаются у изолятов разных видов *Rhodococcus* и обладают высокой степенью консервативности, но при этом не являются обязательным элементом генома.

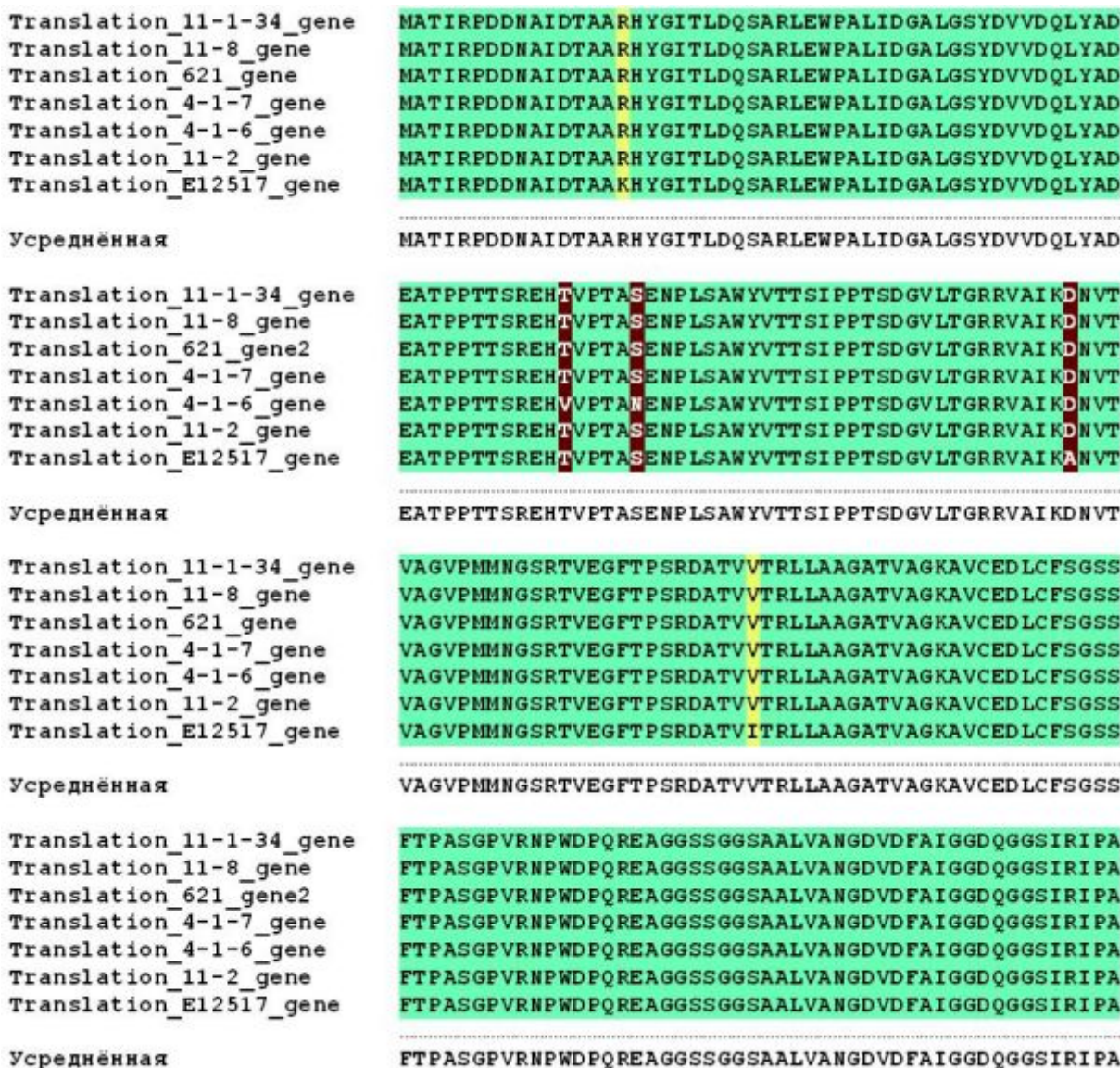


Рис. 3. Сравнение полных белковых последовательностей амидаз *Rhodococcus*.

Работа поддержана программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», 2009–2013 гг., шифр 2009-1.1-201-018-001.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Перцович С.И. и др. Алифатическая амидаза из *Rhodococcus rhodochrous* – представитель семейства нитрилаз/цианидгидратаз // Биохимия. 2005. Т. 70. С. 1556-1565.
2. Максимов А.Ю. и др. Влияние нитрилов и амидов на рост и нитрилгидратазную активность штамма

- Rhodococcus* sp. gt1 // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 1. С. 63-68.
3. Клонирование ДНК. Методы. М., 1988. 538 с.
4. Демаков В.А. и др. Почвенные актинобактерии рода *Rhodococcus*, обладающие высокой амидазной активностью // Вестник Пермского ун-та. 2009. С. 79-83.
5. Кузнецова М.В. и др. Распространение нитрилконвертирующих бактерий в почвах Пермского края // Вестник Пермского ун-та. 2007. Т. 5. С. 96-99.
6. Asano Y. Overview of screening for new microbial catalysts and their uses in organic synthesis - selection and optimization of biocatalysts // J. Biotechnol. 2002. V. 94. P. 65-72.
7. Banerjee A., Sharma R., Banerjee U.C. The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 60. P. 33-44.

8. Cowan D. Biochemistry and biotechnology of mesophilic and thermophilic nitrile metabolizing enzymes // *Extremophiles*. 1998. V. 2. № 3. P. 207-216.
9. Fornaud D., Arnaud A. Aliphatic and enantioselective amidases: from hydrolysis to acyl transfer activity // *Appl. Microbiol.* 2001. V. 91. № 9. P. 381-393.
10. Kotlova E.K. et al. Isolation and primary characterization of an amidase from *Rhodococcus rhodochrous* // *Biochemistry*. 1999. V. 64. N. 4. P. 384-389.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF GENE SEQUENCES OF AMIDASES OF SOIL ACTINOBACTERIA *RHODOCOCCUS*

© 2011 Yu.A. Pavlova<sup>1</sup>, A.N. Neustroeva<sup>1</sup>, A.Yu. Maksimov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Perm State University, Perm

<sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of RAS, Perm

The soil culture of *Rhodococcus* actinobacteria with thermostable amidase activity have been investigated. PCR and sequencing of amidase genes were performed. The homologous sequences that are to known genes of the amidase of *R. erythropolis* (GenBank, M88614), *R. erythropolis* (GenBank, E12517) and *R. rhodochrous* N774 were identified.

**Key words:** *actinobacteria, amidase, sequencing, Rhodococcus.*