

**ОЧИСТКА И РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА  
ТЕТРАМЕРНОЙ ФОРМЫ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ  
ИЗ БАКТЕРИЙ *SPHAEROTILUS NATANS*****М. А. Арабцева, А. Т. Епринцев, М. И. Фалалеева, И. В. Парфенова***Воронежский государственный университет*

Поступила в редакцию 9.03.2008 г.

**Аннотация.** Методом многостадийной очистки (экстракция фермента, гель-фильтрация, ионообменная и гель-хроматографии) из бактерий *Sphaerotilus natans* штамм Д-507, выращенных в условиях миксотрофного роста, получен электрофоретически гомогенный препарат малатдегидрогеназы (К.Ф. 1.1.1.37) с удельной активностью 4,65 Е/мг белка и степенью очистки в 75 раз. Изучены кинетические и физико-химические характеристики фермента. Установлено, что бактериальная малатдегидрогеназа является изологическим тетрамером с молекулярной массой 141 кДа.

**Ключевые слова:** малатдегидрогеназа, очистка, тетрамер, *sphaerotilus natans*, молекулярная масса

**Abstract.** Malate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37) from bacterium *Sphaerotilus natans* strain D-507 cultivated under mixotrophic conditions of growth was isolated and purified 75 times using a multistep purification including the enzyme extraction, gel-filtration, ion-exchange chromatography, and gel-chromatography. The enzyme was homogenous according to the electrophoresis date. Its activity was 4,65 U/mg proteins. Kinetic and physical-chemical characteristics of enzyme were studied. It was show that bacterial malate dehydrogenase is isological tetrameric structure with molecular mass of 141 kDa.

**Key words:** malate dehydrogenase, purification, tetramer, *sphaerotilus natans*, molecular mass

**ВВЕДЕНИЕ**

Бактерии рода *Sphaerotilus* являются представителями бесцветных серобактерий. Из термальных источников Краснодарского края выделен новый штамм бактерий *Sphaerotilus natans*, который способен не только к органотрофному типу питания, но и к миксотрофному в присутствии восстановленных соединений серы.

При адаптации клеточного метаболизма к меняющимся условиям среды организм осуществляет регуляцию метаболизма на уровне отдельных ферментов. Одним из таких ферментов является малатдегидрогеназа (МДГ, КФ 1.1.1.37), которая обеспечивает протекание как энергетического, так и конструктивного обменов [1].

Известно, что у фототрофных анаэробных бактерий МДГ, выполняющая конструктивную функцию, имеет тетрамерное строение [2].

В работах, выполненных на нашей кафедре, было показано, что смена типов питания сопровождается перестройкой углеродного метаболизма на уровне отдельных молекул. При переходе бактерий *Beggiatoa leptomitiformis* от органотрофного типа

питания к миксотрофному происходит изменение четвертичной структуры молекулы МДГ [1].

Изучение субъединичного строения и регуляторных свойств малатдегидрогеназы у бактерий *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 представляется интересным, т.к. природные местообитания бактерий характеризуются частой сменой кислородного режима и перепадами концентраций сульфида. В связи с этим данные микроорганизмы способны переходить от одного типа питания к другому и могут использовать в качестве источник энергии как органические доноры электронов, так и восстановленные соединения серы.

Цель работы состояла в исследовании структуры и свойств МДГ у *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 в условиях миксотрофного роста.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Объектом исследования служили матообразующие бесцветные серобактерии рода *Sphaerotilus natans* штамм Д-507, выращенные в условиях миксотрофного роста. Бактерии выделены из термальных источников Краснодарского края.

Для культивирования микроорганизмов использовали питательную среду следующего состава (мг/л):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  — 1.7;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 34.4;

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 22.5;  $CaCl_2$  — 27.5;  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  — 0.25;  $KH_2PO_4$  — 8.5;  $K_2HPO_4$  — 21.5; пептон — 200; лактат — 200; дистиллированная вода; pH среды 7.5. Перед посевом в среды вносили раствор микроэлементов и витаминов —  $1.0 \times 10^{-3}$  (г/л) [3]. Для создания миксотрофных условий в среды вносили тиосульфат 1 г/л.

Суспензию клеток получали путем центрифугирования культуры при 8000 g и 4 °C в течение 20 мин. Клетки отмывали 50 mM *трис*-HCl-буфером (pH 7.5). Клеточный экстракт получали разрушением бактериальных клеток с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Г при мощности 500 Вт и частоте 22 кГц в течение 2 мин на ледяной бане. Супернатант получали после центрифугирования гомогената при 3000 g и 4 °C в течение 5 мин.

Активность МДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм. За единицу активности (*E*) принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 25 °C. Определение общего количества белка проводили по методу Лоури.

Очистку фермента осуществляли по модифицированной схеме, включающей — получение экстракта фермента, гель-фильтрацию на колонке с сефадексом G-25, ионообменную хроматографию на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой.

Молекулярную массу нативного белка определяли с помощью гель-хроматографии через сефадекс G-200, молекулярную массу субъединиц-методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Для построения калибровочной кривой использовали маркерные белки (кДа): фосфорилазу В — 97; БСА — 66,2; яичный альбумин — 45; карбоангидразу — 31; трипсин — 21,5; лизоцим — 14,4.

Электрофорез проводили по модифицированной методике Дэвиса в 9 % полиакриламидном геле [4]. Для специфического проявления МДГ применяли тетразолиевый метод [5]. Для детекции белка использовали методику с нитратом серебра [6].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ ферментного препарата малатдегидрогеназы из бактерий *S. natans*, культивируемых в условиях миксотрофного роста, показал, что в геле при универсальном окрашивании после гель-фильтрации обнаруживалось две полосы. На стадии ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе произошло разделение двух изоформ фермента. Проведенный электрофоретический анализ очи-

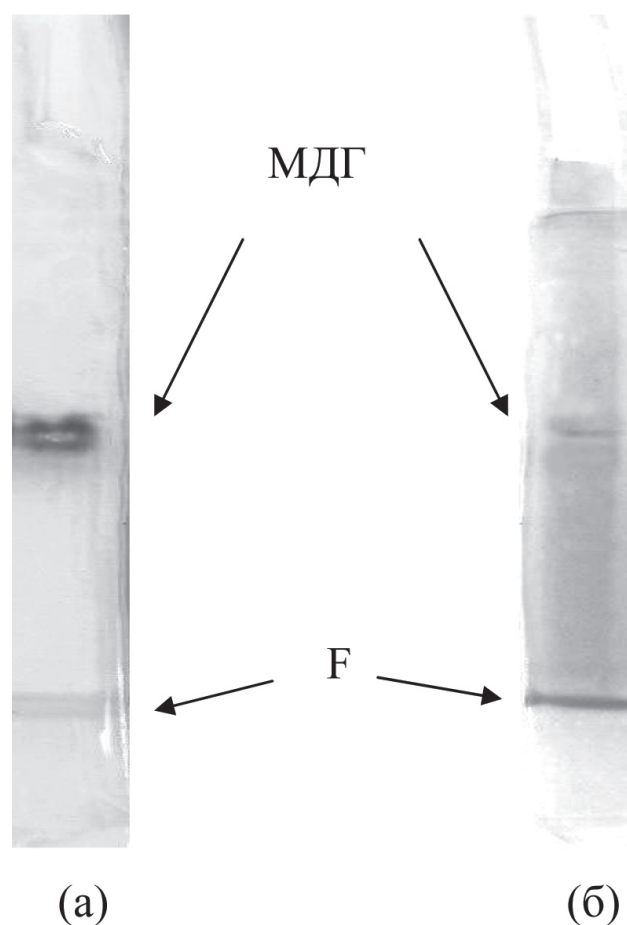


Рис. 1. Электрофореграмма МДГ: специфическое проявление на малатдегидрогеназную активность тетразолиевым методом (а); проявление очищенного препарата универсальным красителем на белок (б). F-фронт (бромфеноловый синий)

щенных препаратов из этих фракций показал, что в геле при универсальном окрашивании проявляется по одной полосе со значениями  $Rf$  0,45 и 0,5, что свидетельствует о гомогенности изоформ МДГ из данного организма. Для дальнейшего исследования была выбрана изоформа фермента с величиной  $Rf$  0,45 (рис. 1).

В ходе четырехстадийной очистки был получен ферментный препарат МДГ из *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 в условиях миксотрофного роста, для которого исследованы физико-химические и регуляторные свойства. Удельная активность фермента составила 4,65 Е/мг белка со степенью очистки в 75 раз (табл. 1).

Методом гель-хроматографии была определена молекулярная масса нативной МДГ, которая составила  $141 \pm 2.8$  кДа. Электрофоретические исследования в присутствии додецилсульфата натрия позволило определить величину молекулярной

Таблица 1

Очистка малатдегидрогеназы из клеток штамма Д-507, выращенных на среде с тиосульфатом

Стадии очистки	Общий объем, мл	Общая активность, Е	Белок, г/мл	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	8.9	19.43 ± 0.58	315.0 ± 9.45	0.062 ± 0.002	1	100
Супернатант	5.7	12.44 ± 0.37	201.6 ± 6.04	0.063 ± 0.002	1.02	64
Гель-фильтрация через сефадекс G25	2.5	10.89 ± 0.32	44.1 ± 1.32	0.247 ± 0.007	1.06	56
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	1.0	1.82 ± 1.82	0.65 ± 0.02	2.78 ± 0.083	44.9	9.4
Гель-хроматография на сефадексе G200	1.0	1.07 ± 0.03	0.23 ± 0.007	4.65 ± 0.13	75	5.5

массы одной субъединицы, которая составила  $35 \pm 1.7$  кДа (рис. 2).

Некоторые свойства гомогенного препарата фермента описаны в табл. 2.

Оптимальные значения рН, при которых обнаруживается максимальная скорость восстановления оксалоацетата и окисления малата, находятся в кислой области. Величина  $K_m$  по оксалоацетату,

определенная методом Лайнуивера-Берка, имела значение 18 мкМ для МДГ в условиях миксотрофного роста, что свидетельствует о высоком сродстве изучаемого фермента к оксалоацетату. Установленная величина  $K_m$  по малату, которая указывает на более низкое сродство фермента к этому субстрату, составила 175 мкМ для МДГ при миксотрофном росте. Выявлено, что высокие концентрации оксалоацетата ингибируют работу фермента. Константа субстратного ингибирования (оксалоацетат) для МДГ из бактерий в условиях культивирования с тиосульфатом составила 2,8 мМ (рис. 3).

Таблица 2

Кинетические и физико-химические характеристики МДГ у бактерий *S. natans* штамм Д-507

Свойства	Миксотрофный рост
Молекулярная масса, кДа	141
Молекулярная масса субъединицы, кДа	35
рН-оптимум (оксалоацетат)	6.0
рН-оптимум (малат)	6.5
$K_m$ , мкМ (оксалоацетат)	18
$K_m$ , мкМ (НАДН)	31
$K_m$ , мкМ (малат)	175
$K_m$ , мкМ (НАД <sup>+</sup> )	204
$K_{si}$ , мкМ (оксалоацетат)	2.4

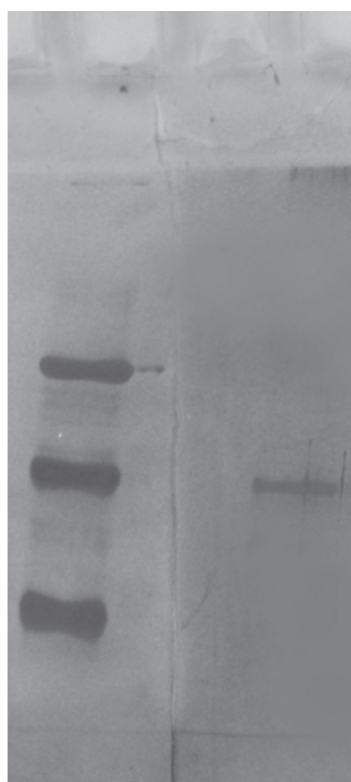


Рис. 2. Ds-Na-электрофорез МДГ из *S. natans* (сверху вниз): 1 — фосфорилаза b, 2 — БСА, 3 — овальбумин, 4 — карбоангидроза, 5 — ингибитор трипсина, 6 — лизоцим

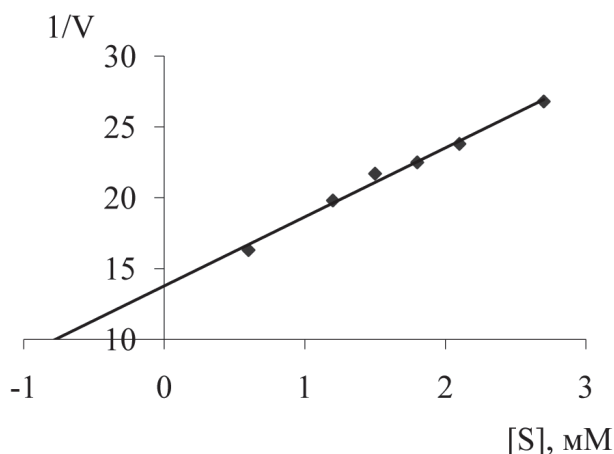


Рис. 3. Определение величины константы субстратного ингибирования оксалоацетатом

Было исследовано влияние ионов двухвалентных металлов. Катионы  $Mg^{2+}$  и  $Ba^{2+}$  в концентрациях 4—40 мМ активируют МДГ. При этом определены константы активации, которые составили для ионов  $Mg^{2+}$  5,26 мМ, для ионов  $Ba^{2+}$  — 9,1.

Ионы  $Mn^{2+}$  (4—40 мМ) оказывают ингибирующее действие. Ионы  $Ca^{2+}$  в исследуемых концентрациях влияние на фермент не оказывают.

Температурный оптимум МДГ при восстановлении оксалоацетата равнялся 60 °С. При окислении малата 40 °С. На основании полученных данных построены графики Аррениуса для реакций окисления и восстановления малата. Показано, что графики описываются прямыми линиями. При миксотрофном росте значения энергии активации составили для прямой реакции — 4,3 кДж/моль, для обратной реакции — 6 кДж/моль (рис. 4).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Применяемая схема многостадийной очистки позволила получить ферментный препарат МДГ в электрофоретически гомогенном состоянии из бактерий *S. natans* штамм Д-507 с удельной активностью 4,65 Е/мг белка. Были исследованы физико-химические и регуляторные свойства фермента, выделенного из бактерий культивируемых в присутствии тиосульфата.

Сравнение результатов гель-хроматографии и электрофореза с додецилсульфатом натрия показывает, что МДГ из *S. natans* штамм Д-507 в условиях миксотрофного роста представлена изолированным тетрамером с молекулярной массой субъединиц 35 кДа. По результатам некоторых исследователей тетрамерная форма МДГ участвует в протекании конструктивного метаболизма, а димерная изофор-

ма обеспечивает энергетические процессы, что обусловлено типом питания бактерий.

Сравнение кинетических параметров МДГ из данных микроорганизмов показало, что сродство фермента к оксалоацетату выше, чем к малату.

Многочисленные исследования указывают на то, что высокие концентрации ионов стабилизируют четвертичную структуру молекулы фермента. Наши исследования показали, что двухвалентные ионы магния и бария в концентрации от 4 до 40 мМ оказывают активирующее действие. Графоаналитическим методом (по Диксону) установлено, что активация осуществляется по неконкурентному типу. Двухвалентные ионы кальция в данной концентрации на фермент не влияют. Ионы марганца в пределах концентраций 4—40 мМ оказывают ингибирующее действие на малатдегидрогеназу по бесконкурентному типу.

Высокое значение температурного оптимума, возможно, связано с природным местообитанием бактерий. Штамм Д-507 выделен из термальных источников и относится к умеренным термофилам.

Таким образом, полученная в электрофоретически гомогенном состоянии малатдегидрогеназа из бактерий *Sphaerotilus natans* штамм Д-507, выращенных в условиях миксотрофного роста, является гомотетрамером и участвует в обеспечении функционирования глиоксилатного цикла.

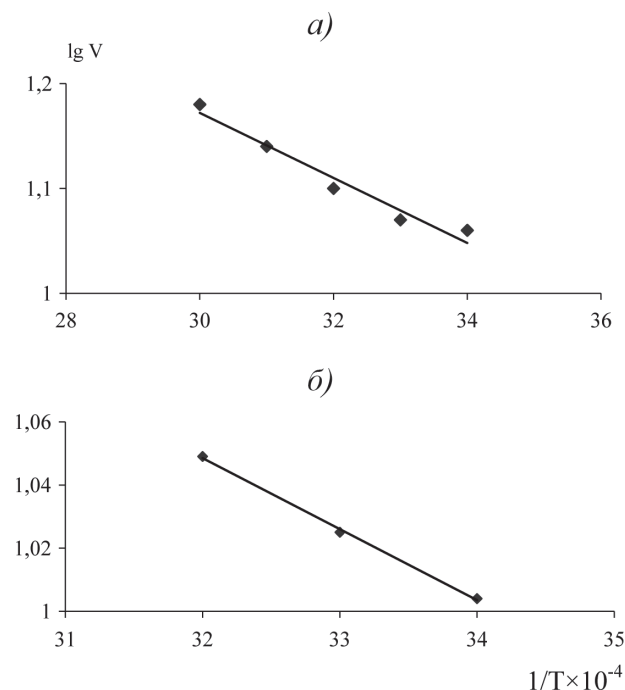


Рис. 4. График Аррениуса: а — для реакции восстановления оксалоацетата; б — для реакции окисления малата

Авторы выражают благодарность проф. Грабович М. Ю. и магистранту Гридневой Е. В. за предоставленную культуру бактерий *Sphaerotilus natans* штамм Д-507.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Епринцев А. Т. Роль изоформ малатдегидрогеназы в регуляции анаболических процессов у бесцветных серобактерий *Beggiatoa leptomitiformis* Д-402 / А. Т. Епринцев, М. И. Фалалеева, М. Ю. Грабович и др. // Микробиология. 2004. Т. 73. № 4. С. 437—442.

2. Климова М. А. трансформация четвертичной структуры малатдегидрогеназы при росте пурпурных бактерий на различных органических кислотах / М. А. Климова, А. Т. Епринцев, К. Ф. Шихалиева // Тезисы докладов третьей региональной конференции мо-

лодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой». — Саратов (10—13 октября). — 2006. — С. 42.

3. Дубинина Г. А. Образование перекиси водорода *Beggiatoa leptomitiformis* / Г. А. Дубинина, М. Ю. Грабович, В. В. Чурикова // Микробиология, 1990. Т. 59. С. 425—431.

4. Davis B.J. Disk electrophoresis II-method and application to human serum proteins / B.J. Davis // Ann. NY Acad. Sci., 1964. V. 121. P. 404—427.

5. Гааль Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медьши, Л. Верецкий. — М.: Мир, 1982. 446 с.

6. Shevchenko A. Mass spectrometric sequencing of protein from silver-stained polyarylamide gels / A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm // Anal. Chem., 1996. V.68. P. 850—858.

---

**Арабцева Мария Александровна** — аспирант 3 года обучения кафедры физиологии и биохимии растений биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета; тел. (4732) 208-877, e-mail: mariaarabts@mail.ru

**Епринцев Александр Трофимович** — профессор, зав. кафедрой физиологии и биохимии растений Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 208-877, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

**Фалалеева Марина Ивановна** — доцент Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 208-877, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

**Парфенова И. В.** — магистрант 2 года обучения биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 208-877, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

**Arabtseva Maria A.** — PhD student, Faculty of Biology and Soil Science, Voronezh State University; tel.: (4732) 208-877, e-mail: mariaarabts@mail.ru

**Eprintsev Aleksander T.** — the head of department, professor, Faculty of Biology and Soil Science, Voronezh State University; tel.: (4732) 208-877, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

**Falaleeva Marina I.** — assistant professor, Faculty of Biology and Soil Science, Voronezh State University; tel.: (4732) 208-877, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

**Parfenova I. V.** — master student, Faculty of Biology and Soil Science, Voronezh State University; tel.: (4732) 208-877, e-mail: bc366@bio.vsu.ru