



АЛКАЛНА ФОСФАТАЗА ПРИ *BACILLUS*

Соня Костадинова, Мариана Мърхова

*ПУ „Паисий Хилендарски“, Биологически факултет
Катедра „Биохимия и микробиология“*

Abstract. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains were found to produce alkaline phosphatase into the culture medium at the middle of stationary phase of growth. The enzyme secretion was maximal when bacteria were cultured in low phosphate medium. An extracellular alkaline phosphatase was purified from the culture medium of *Bacillus cereus* by ammonium sulphate precipitation, anion-exchange and size-exclusion chromatographies. Specific activity of the purified enzyme was 72.5 units per mg protein and the recovery of enzyme activity was 6.4 %.

Key words: alkaline phosphatase, *Bacillus cereus*, enzyme purification

ВЪВЕДЕНИЕ

Алкалната фосфатаза (ЕС 3.1.3.1.) катализира неспецифична хидролиза на фосфомоноестери. Ензимът отстранява фосфатна група от 5- или 3- позиция на различни типове молекули. Проявява оптимална активност в алкалната област (рН 8.5-10.5). Алкална фосфатаза продуцират микроорганизми, принадлежащи към различни таксономични групи: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus intermedius*, *Mycobacterium smegmatis*, *Thermotoga maritima*, *Haloarcula marismortui* (BRAIBANT & CONTENT, 2001; LEWIS *et al.*, 1998; PRAGAI *et al.*, 2001; KRIAKOV *et al.*, 2003; WOJŚCIECHOWSKI *et al.*, 2002; YANG & METCALF, 2004).

Ензимът се използва като маркер в имуноензимни методи; в молекулярно биологични процедури за отстраняване на терминалния моноестерифициран фосфат от рибо- и дезоксирибонуклеотиди; предовратява лигирането на ДНК; при получаване на радиоактивно белязана ДНК.

Синтезираните от микроорганизми алкални фосфатази представляват интерес поради топологичните и структурни особености на конкретния за всеки вид ензим. Проучването им разкрива механизмите на фосфатната обмяна, метаболитния транспорт и микробната физиология.

Сравнително малко се знае за регулацията, процесинга, структурата и активността на алкалните фосфатази при Грам-положителни бактерии. От друга

страна, протеиновата секреция при тези бактерии е предмет на интерес от гледна точка на продукцията на промишлени ензимни препарати.

Цел на настоящето изследване е проучване на секрецията на алкална фосфатаза (AP) при щамове *Bacillus cereus* и *B.thuringiensis* и получаване на високо пречистен ензимен препарат.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Бактериални щамове и културални условия

Изследвани са 35 щама *Bacillus cereus*, 23 щама *B.thuringiensis* и 12 щама *B.sphaericus* от колекцията на катедра „Биохимия и микробиология“ на ПУ „П.Хилендарски“.

За селекция на продуценти на алкална фосфатаза щамовете са култивирани на агарова среда, съдържаща 2 mM p-NPP. Продукцията на алкална фосфатаза е проучена на 6 хранителни среди: среда на GERASIMENE *и др.* (1983), среда на ZWAAL (1971), среда с ниско фосфатно съдържание (LPM), среда с високо фосфатно съдържание (HPM) (PRAGAI & HARWOOD, 2000), хранителен бульон (НЦЗПБ), съдържащ 1 mM MgSO₄ и 20 mM NaCl, LB бульон.

Култивирането е проведено при температура 30°C, на клатачка (150 об/мин).

Определяне на активността на алкална фосфатаза (IKEZAWA et al., 1986)

Реакционната смес съдържа: 500 µl субстратен разтвор (6 mM p-NPP, 3 mM MgCl₂, 0.5 M Tris-HCl буфер с pH 10.0) и 100 µl ензим. Ензимната реакция се провежда от 10 до 30 min на 37°C; прекъсва се с 400 µl 0.4 N NaOH. Измерва се екстинкция при 405 nm срещу контрола – неинкубирана проба. Активността се определя с моларен екстинкционен коефициент.

Една единица алкална фосфатаза катализира хидролизата на 1 µmol субстрат за 1 min при специфичните условия на действие – pH 10.0 и 37°C.

Определяне на общ белтък

Белтъчното съдържание е определяно по методите на HATREE (1972) и BRADFORD (1976) с говежди серумен албумин (SERVA) като стандарт.

Пречистване на алкална фосфатаза

Bacillus cereus щам 15 е използван като продуцент на алкална фосфатаза. Културалната супернатанта е наситена до 70 % с (NH₄)₂SO₄ при температура 0 - 4°C и непрекъснато разбъркване. Сместа е оставена 2 h при 0°C; полученият преципитат е отделен чрез центрофуриране за 15 min при 13000 g и 0°C и разтворен в 0.1 M Tris-HCl, pH 7.2. Този препарат е използван като изходен материал за колонната хроматография.

DEAE-cellulose колонна хроматография. Ензимният разтвор е нанесен на колона с DEAE-cellulose (5 x 2.5 cm, i.d.) уравновесена с 0.03 M Tris-HCl (pH 7.8). Колоната е промита с три колонни обема от същия буфер и елюирана с линейен градиент на NaCl (0 – 1 M). Събирани са фракции по 5 ml. Всички процедури са проведени при температура 0 - 4°C.

Гел-филтрация на Sephadex G-200. Ензимният препарат, получен след йонобменната хроматография е нанесен на колона (95 x 2.1 cm, i.d.) със Sephadex G-200. Събирани са фракции по 6 ml със скорост 15 ml/h.

РЕЗУЛТАТИ

Седемдесет щамове от видове *Bacillus cereus*, *B.thuringiensis* и *B.sphaericus* са проучени за продукция на алкална фосфатаза на селективна агарова среда, съдържаща 2 mM p-нитрофенилфосфат (NPP) и по метода на Ikezawa и сътр. (1986).

Всички изследвани щамове *Bacillus cereus* синтезират алкална фосфатаза. Положителна реакция е отчетена при 70% от *B.thuringiensis* щамовете, докато при *B.sphaericus* резултатите са отрицателни.

Осемнадесет щамове *B.cereus* и десет щамове *B.thuringiensis* са изследвани за наличие на извънклетъчна и вътреклетъчна фосфатаза.

Щамовете са култивирани 20 h, на 30°C, на клатачка, на среда с ниско фосфатно съдържание (LPM) с pH 6.9. Културалната среда е центрофугирана 30 min на 10 000 об/min при 0°C за отделяне на биомасата. Екстрацелуларната активност е определена в културалната супернатанта.

Клетките са суспендирани в 0.01 M Tris-HCl (pH 7.5) и инкубирани 1 h на 30°C с разбъркване в присъствие на лизоцим и дезоксирибонуклеаза до крайна концентрация 0.5 mg/ml и 2 µg/ml, респективно. Полученият клетъчен лизат е центрофугиран 1 h на 15 000 g, след което е определена фосфатазната активност в разтворимата фракция (Sugahara et al., 1991). Резултатите са представени в Таблица 1.

Щамовете *Bacillus* показаха вътреклетъчна и ниска извънклетъчна фосфатаза. *Bacillus cereus* е по-добър продуцент на алкална фосфатаза в сравнение с *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus cereus щамове NoNo 9, 15, 55 L, 63 и *B.thuringiensis* var. *kenyae* 5 са изследвани за продукция на извънклетъчна алкална фосфатаза на 6 различни хранителни среди (Таблица 2).

Удачна за продукция на алкална фосфатаза е модифицираната от нас среда с ниско фосфатно съдържание със състав (g/l): NH₄Cl – 3.0; MgSO₄·7H₂O – 0.25; калциев ацетат – 0.02; MnCl₂ Ц 0.1; пептон – 5.0; глюкоза – 0.5; L-аргинин – 0.05 g; L-триптофан – 0.05 g; L-метионин – 0.05 g; pH 6.9. На тази среда специфичната активност варира от 0.09 до 0.31 U/mg протеин.

В културалните супернатанти на изследваните *B.cereus* щамове е установена и естеразна активност по отношение на p-нитрофенилацетат, p-нитрофенилпропионат и p-нитрофенилбутират (Sigma).

Най-висока активност е отчетена при щам *B.cereus* 15, който е проучен за установяване на динамиката на фосфатазната секреция (Фиг. 1). Секрецията на алкална фосфатаза е най-висока в средата на стационарната фаза на растеж (16 h), което не е свързано с лизис на клетките. Ензимният максимум е отчетен при pH на средата 7.4.

Таблица 1. Фосфатазна активност при *B.cereus* и *B.thuringiensis*

Щам	Извънклетъчна активност	Вътреклетъчна активност	Щам	Извънклетъчна активност	Вътреклетъчна активност
<i>B.cereus</i> 2	0.2	1.0	<i>B.cereus</i> 63	1.5	2.7
<i>B.cereus</i> 3	0.4	2.4	<i>B.cereus</i> 89	0.6	2.5
<i>B.cereus</i> 7	0.6	2.2	<i>B.cereus</i> 105	0.5	2.6
<i>B.cereus</i> 8	0.5	1.6	<i>B.cereus</i> 107	1.0	2.3
<i>B.cereus</i> 9	1.2	2.3	<i>B.thuringiensis</i> 10	0.5	1.5
<i>B.cereus</i> 11	0.9	2.5	<i>B.thuringiensis</i> 14	0.7	1.5
<i>B.cereus</i> 15	2.5	4.2	<i>B.thuringiensis</i> 17	0.6	1.7
<i>B.cereus</i> 23	0.2	1.3	<i>B.thuringiensis</i> 20	0.5	0.8
<i>B.cereus</i> 25	0.8	2.5	<i>B.thuringiensis</i> MT-USR	0.7	1.6
<i>B.cereus</i> 26	0.7	2.6	<i>B.thuringiensis</i> var.th.17	0.6	1.3
<i>B.cereus</i> 28	0.6	1.7	<i>B.thuringiensis</i> var.kenyae 5	1.5	1.8
<i>B.cereus</i> 30	0.5	1.6	<i>B.thuringiensis</i> 1H	0.3	1.5
<i>B.cereus</i> 51	0.8	2.5	<i>B.thuringiensis</i> 16H	0.5	1.2
<i>B.cereus</i> 55 L	1.2	3.5	<i>B.thuringiensis</i> 19H	0.4	1.6

* активността е представена в U/ml

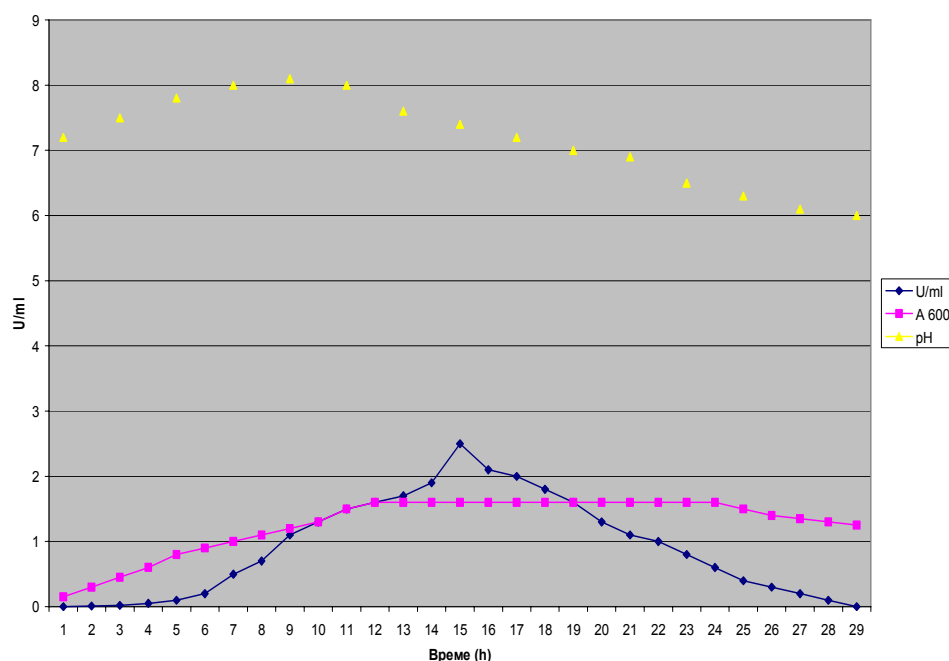
** резултатите са средни от пет повторения

Таблица 2. Продукция на алкална фосфатаза от щамове *Bacillus*

Щам No	Среда на Gerasimene *	Среда на Zwaal	Модифицирана LPM	HPM	Обогатен бульон	LB
<i>B.cereus</i> 9	0.06	0.01	0.15	0	0.01	0.06
<i>B.cereus</i> 15	0.08	0.03	0.31	0.01	0.08	0.09
<i>B.cereus</i> 55 L	0.07	0.03	0.1	0	0.06	0.1
<i>B.cereus</i> 63	0.08	0.02	0.09	0	0.05	0.05
<i>B.thuringiensis</i> var. kenyaе 5	0.07	0.05	0.14	0	0.03	0.04

* активността е представена в U/mg протеин

** резултатите са средни от пет повторения



Фиг.1. Продукция на алкална фосфатаза от щам *B.cereus* 15

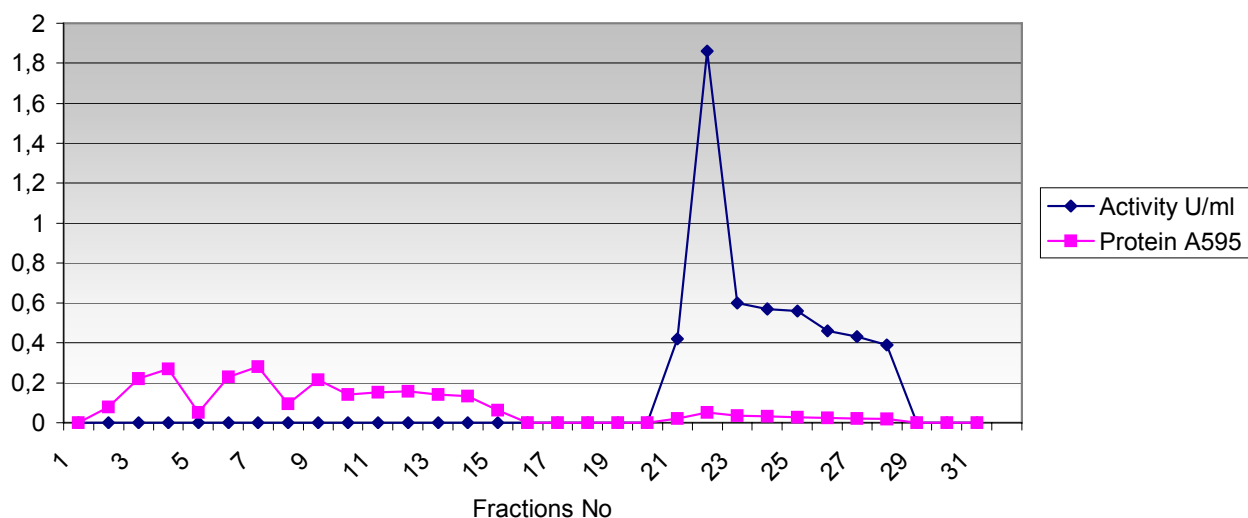
Алкалната фосфатаза от *Bacillus cereus* 15 е пречистена чрез тристъпална схема представена в Таблица 3.

Насищането на културалната супернатанта с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ доведе до 10 кратна редуция на обема и 4-кратно увеличение на ензимната активност. Отчетена е обаче, загуба на приблизително 60% от активността, което говори за ниска стабилност на ензима. Преципитацията с 2-пропанол (не е отразено на схемата) доведе до приблизително същата загуба на активност.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -преципитатът е диализиран и подложен на DEAE-cellulose йонобменна хроматография. Фосфатазната активност се съдържа в преминаващата фракция. В резултат на анионобменната хроматография ензимът е пречистен 8.5 пъти, с добив по активност 29% (спрямо предишния етап).

Фракциите, съдържащи фосфатазна активност са събрани, концентрирани и нанесени на колона със Sephadex G 200 (Фиг. 2). Колоната е уравновесена с 0.03 M Tris-HCl (pH 7.8) и елюирана със същия буфер. Фосфатазната активност се елюира като минорна протеинова фракция между 400 и 456 ml.

В резултат на приложената тристъпална схема алкалната фосфатаза на *Bacillus cereus* е пречистена 234 пъти с добив по активност 6.4 % (Таблица 3).



Фиг.2. *Sephadex G 200* хроматография на алкална фосфатаза от *Bacillus cereus* в 0.03 M Tris-HCl буфер (pH 7.8) и скорост 15 ml/h

Таблица 3. Пречистване на алкална фосфатаза от *B. cereus*

Етап	Общ белтък (mg)	Обща активност (U)	Специфична активност (U/mg)	Пречист-ване (пъти)	Добив (%)
Културална супернатанта	800	250	0.31	-	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ преципитат	80	99.2	1.24	4	39.7
DEAE – cellulose	2.7	29.2	10.8	34	11.7
Sephadex G 200	0.22	16.0	72.7	234	6.4

Резултатите са средни от 5 цикъла на пречистване

ДИСКУСИЯ

Алкалната фосфатаза е неспецифична фосфомоноестераза, която повечето бактериални продуценти синтезират при фосфатен дефицит, като средство за адаптация към конкретните неблагоприятни условия на средата (WANNER, 1996).

Видовете *Bacillus* продуцират алкална фосфатаза в условия на фосфатен недостиг и при спорулация (BOOKSTEIN *et al.*, 1990; PRAGAI *et al.*, 2001; YANG : METCALF, 2004; WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2002). *Bacillus subtilis* синтезира два мембранно-свързани ензима, докато при *B.licheniformis* е доказана секретирuема алкална фосфатаза (HULETT, 1984).

Изследваните от нас 35 щамa *Bacillus cereus* синтезират алкална фосфатаза. Положителна реакция е отчетена и при 70% от културите на *B.thuringiensis*. При *B.sphaericus* резултатите са отрицателни. Всички

положителни щамове синтезират извънклетъчна и вътреклетъчна алкална фосфатаза. Извънклетъчният ензим е приблизително 3-4 пъти по-слабо активен в сравнение с вътреклетъчния, което показва, че секретирuемата активност е около 25-30% от общата.

Пет щама *Bacillus* са проучени за продукция на извънклетъчна алкална фосфатаза на 6 хранителни среди. Най-удачна се оказа модифицираната от нас среда с ниско фосфатно съдържание. На НРМ активност липсва, което потвърждава литературните данни за условията на синтез на ензима и неговото предназначение (PRAGAI *et al.*, 2001; WHITE & METCALF, 2002; YANG & METCALF, 2004).

Bacillus cereus щам 15 е селектиран като продуцент на алкална фосфатаза. Проследяването на динамиката на ензимната секреция показва максимум на ензимната активност в културалната среда в средата на стационарната фаза на растеж. Секрецията на ензима не е съпроводена от лизис на клетките.

Алкалната фосфатаза на *B.cereus* е пречистена 234 пъти с добив по активност 6.4% чрез тристъпална схема, включваща насищане с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, анионообменна хроматография и гел-филтрация. Преципитацията с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ не е ефикасен етап, поради загуба на около 60 % от активността. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -преципитатът, обаче, запазва продължително време (до 6 месеца) активност, поради което този етап е включен в схемата за пречистване. В резултат на последващи йонообменната хроматография и гел-филтрацията АР на *B.cereus* е пречистена 234 пъти. Полученият препарат е със специфична активност 72.7 U/mg и е свободен от естеразна активност.

В бъдещи изследвания предстои да се изолира и пречисти вътреклетъчна АР от продуцентния щам *B.cereus* и се сравнят някои молекулни свойства на ензимите.

БЛАГОДАРНОСТИ

Представеното изследване е финансирано от тема 01-Б-53 на фонд „Научни изследвания“ на ПУ „Паисий Хилендарски“ – Пловдив.

ЛИТЕРАТУРА

- BOOKSTEIN C., C. EDWARDS, N. KAPP, M. HULETT. 1990. J. Bacteriol., 172, 7, 3730-3737.
- BRADFORD M. 1976. Anal. Biochem., 72, 248-254.
- BRAIBANT M., J. CONTENT. 2001. FEMS Microbiol. Lett., 195, 121–126.
- GERASIMENE G. B., Y. P. KAKARYUNAITE, V. V. KULENE, A. A. GLEMZHA, K. K. YANULAITENE. 1983. Prikl. Biochim. Mikrobiol. 21:184-189.
- HARTREE F. 1972. Anal. Biochem., 42, 422-427.
- HULETT M. 1984. J. Bacteriol., 158, 3, 978-982.

- IKEZAWA H. M. MATSUSHITA, M. TOMITA, R. TAGUCHI. 1986. Arch. Biochem. Biophys. 249: 588-595.
- LEWIS P., L. JUAN WU, J. ERRINGTON. 1998. J. Bacteriol., 180, 13, 3276-3284.
- KRIAKOV J. S. LEE, W. JAKOBS. 2003. J. Bacteriol., 185, 4983-4991.
- PRESCOTT L., HARLEY, J., KLEIN, D. 2003. Microbiology (K. Kane, ed.), 2nd Ed., Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, IA.
- PRAGAI Z., C. HARWOOD. 2000. J. Bacteriol., 182, 6819-6823.
- PRAGAI Z., C. ESCHEVINS, S. BRON, C. HARWOOD. 2001. J. Bacteriol., 183, 2505-2515.
- WANNER B. L. 1996. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon, p. 1357–1381. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed., vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.
- WHITE A. K., W. W. METCALF. 2002 J. Biol. Chem., 277, 38262–38271.
- WOJCIECHOWSKI C., J. CARDIA, E. KANTROWITZ. 2002. Protein Science, 11, 903-911.
- ZWAAL R. F. A. ET. AL., 1971, Biochim. Biophys. Acta, 233, 474-479.
- YANG K., W. METCALF. 2004. PNAS, 101, 21, 7919-7924.

ALKALINE PHOSPHATASIS IN *BACILLUS*

Sonya Kostadinova, Mariana Marhova

*University of Plovdiv "St. Paisii Hilendarski", Faculty of Biology
Department "Biochemistry and Microbiology"*

(Summary)

Bacillus cereus and *Bacillus thuringiensis* strains were found to produce alkaline phosphatase into the culture medium at the middle of stationary phase of growth. The enzyme secretion was maximal when bacteria were cultured in low phosphate medium. An extracellular alkaline phosphatase was purified from the culture medium of *Bacillus cereus* by ammonium sulphate precipitation, anion-exchange and size-exclusion chromatographies. Specific activity of the purified enzyme was 72.5 units per mg protein and the recovery of enzyme activity was 6.4 %.