

УДК 579.25

**А. В. Максимова, М. В. Кузнецова**

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЖЕЛЕЗОСОДЕРЖАЩИХ НИТРИЛГИДРАТАЗ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCUS*

Проведена детекция генов, кодирующих  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы железосодержащих нитрилгидратаз, среди альдоксим- и нитрилутилизующих микроорганизмов, выделенных из образцов природных и антропогенно-загрязненных почв. Встречаемость генов фермента не зависела от субстрата, на котором были выделены бактерии ( $p = 0.73$ ). Показана высокая гомология *nha* и *nhb* с известными последовательностями нитрилгидратаз из базы данных GenBank (от 84 до 99%). Секвенирование генов не выявило мутаций в областях, кодирующих активные или регуляторные центры ферментов. Отмечено преобладание замен среди штаммов, выделенных из загрязненных почвенных образцов (66.7% для  $\alpha$ -субъединицы и 70.0% для  $\beta$ -субъединицы). Полученные аминокислотные последовательности ферментов почвенных изолятов содержали как характерные для рода *Rhodococcus*, так и уникальные замены аминокислотных остатков. У штамма *R. erythropolis* B4-4, выделенного из почвы, загрязненной акриламидом, обнаружена радикальная аминокислотная замена тирозина на серин в 85 сайте  $\alpha$ -субъединицы.

**Ключевые слова:** почвенные бактерии рода *Rhodococcus*; нитрилгидратаза; аминокислотные замены.

**A. V. Maksimova, M. V. Kuznetsova**

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

## CHARACTERISATION OF FE-CONTAINING NITRILE HYDRATASES IN *RHODOCOCCUS* STRAINS ISOLATED FROM SOIL

Detection of genes encoding  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of Fe-containing nitrile hydratases was fulfilled among aldoxime- and nitrile-utilizing microorganisms isolated from the samples of natural and anthropogenically contaminated soils. The occurrence of enzyme genes did not depend on substrate where the bacteria were isolated ( $p=0.73$ ). High homology of *nha* and *nhb* to well-known nitrile hydratase sequences from GenBank database (from 84 to 99%) was demonstrated. Gene sequencing did not reveal mutations in sites encoding enzyme active centres. The predominance of substitutions was noted among strains isolated from contaminated soil samples (66.7% for  $\alpha$ -subunit and 70.0% for  $\beta$ -subunit). Obtained amino acid sequences of enzymes in soil isolates contained both typical for *Rhodococcus* and unique substitutions of amino acid residues. Radical amino acid substitution of tyrosine for serine in 85 site of  $\alpha$ -subunit was demonstrated in strain *R. erythropolis* B4-4 isolated from acrylamide-contaminated soil.

**Key words:** soil bacteria of the genus *Rhodococcus*; nitrile hydratase; amino acid substitution.

За последние 20 лет опубликовано большое количество работ, посвященных исследованию бактериальных культур, способных утилизировать нитрилы карбоновых кислот. Это связано с тем, что нитрилгидролизующие бактерии имеют большой потенциал для промышленного производства акриламида и никотиламида, а также для биоремедиации загрязненных нитрильными соединениями территорий [Yamada, Kobayashi, 1996; Holtze et al., 2008].

Главными источниками для выделения нитрил-

конвертирующих организмов являются почва, прибрежные морские осадки и глубоководные отложения. Известно, что в почвах с химической нагрузкой происходит активное размножение и накопление бактерий, способных усваивать загрязняющие вещества. Так, Verma и Sangave выделили *Bacillus thuringiensis* из почвы, отобранной с предприятия по производству бензонитрила, способный утилизировать ароматические нитрилы [Verma, Sangave, 2014]. Штамм *Rhodococcus* sp. MTB5,

изолированный из загрязненной нитрильными гербицидами сельскохозяйственной почвы, полностью конвертировал 30 мМ бензонитрил и был способен расти в среде с добавлением 60 мМ субстрата. Также этот штамм оказался активен в отношении алифатических нитрилов [Mukram et al., 2015]. Большинство трансформирующих нитрилы микроорганизмов являются представителями актиномицетов, среди которых преобладают родококки. В работе [Brandao et al., 2002] авторы установили, что *Rhodococcus erithropolis* доминирует среди культивируемых нитрилутилизующих бактерий в морских и почвенных образцах.

Конверсия нитрильных соединений может происходить несколькими способами, в том числе одностадийным гидролизом, осуществляемым нитрилазой, или двустадийным, в котором участвуют два фермента – нитрилгидратаза и амидаза. Нитрилгидратаза (EC4.2.1.84) – это водорастворимый металлофермент, который катализирует гидратацию нитрильных соединений в соответствующие амиды. Впервые нитрилгидратаза была обнаружена в клетках бактерий *Rhodococcus rhodochrous* J-1 (ранее *Arthrobacter* sp. J-1) в 1980 г. [Asano et al., 1980]. К настоящему времени изучены десятки ферментов из различных видов бактерий, но и сегодня родококки и другие актиномицеты являются наиболее распространенными источниками новых нитрилгидратаз [Prasad, Bhalla, 2010]. Нитрилгидратазы состоят из двух субъединиц ( $\alpha$  и  $\beta$ ), структурные гены (*nha* и *nhb*) которых существенно отличаются в пределах различных таксонов. Несмотря на то, что у представителей рода *Rhodococcus* описана высокая гомология этих ферментов, субстратная специфичность их может существенно варьировать [Brandao et al., 2003].

Цель данной работы – изучение разнообразия нитрилгидратаз у почвенных бактерий рода *Rhodococcus*.

### Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись бактериальные культуры, утилизирующие альдоксимы ( $n = 47$ ) и нитрилы карбоновых кислот ( $n = 52$ ), полученные ранее (2002–2004 гг. и 2006–2008 гг.) в результате селекции на ацето- и/или изобутиронитриле из образцов почв и вод естественной среды и почвы промышленных предприятий (ФГУП «ПЗ им. С.М. Кирова» и ОАО «Бератон»).

Препараты хромосомной ДНК бактерий получали фенольным методом, модифицированным для выделения ДНК из актиномицетов [Гловер и др., 1988].

Для ПЦР-детекции генов, кодирующих  $\alpha$ -субъединицу нитрилгидратазы, использовали праймеры AM5 (5'-CATATGTCAAGTAACGATCGAC-3') и AM8 (5'-ATGCATCAGACGGTGGGAACCTG-3'),  $\beta$ -субъединицу – AM4 (5'-

CATATGGATGGAGTACACGAT-3') и AM6 (5'-ATGCATCAGGCCGACAGGCTCGAG-3'), сконструированные на основе последовательности штамма *Rhodococcus* sp. N-774 (X54074.1). Режим амплификации для всех праймеров включал начальный цикл денатурации – 1 мин. при 94°C, 93°C – 40 с.; 48°C – 60 с.; 72°C – 150 с. (5 циклов); 93°C – 50 с.; 54°C – 70 с.; 72°C – 180 с. (30 циклов) и завершающий цикл 3 мин. при 72°C. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов проводили в 1.2%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием бромидом этидия.

Секвенирование генов *nha* и *nhb* проводили с праймерами, используемыми в ПЦР, с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США), согласно производителю. Полученные последовательности идентифицировали с помощью программы BLAST и базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Перевод нуклеотидных последовательностей в аминокислотные осуществляли в программе BLASTX. Выравнивание последовательностей производили при помощи программы YACWGUI 1.2. Построение дендрограмм производили с помощью программы Vector NTI 10 (Invitrogen, США).

Характер аминокислотных замен определяли по коэффициенту П. Снитта ( $\phi$ ) [Sneath, 1966], показателю М. Волькенштейна ( $\Delta H$ ) [Волькенштейн, 1978], показателю А. Бачинского (ФБА) [Бачинский, 1976], физико-химической дистанции Р. Грэнтсема (GD) [Grantham, 1974] и ее модифицированным значениям ( $GD_M$ ), универсальному эволюционному индексу Х. Танга (U) [Tang et al., 2004].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы STATISTICA 5.0, используя тест Фишера (F-тест).

### Результаты и их обсуждение

Проведена детекция генов железосодержащих нитрилгидратаз среди альдоксим- и нитрилутилизующих микроорганизмов. Встречаемость кодирующих последовательностей фермента не зависела от субстрата, на котором были выделены бактерии ( $p = 0.73$ ).

Обнаруженные гены *nha* ( $n = 28$ ) и *nhb* ( $n = 26$ ) у штаммов *Rhodococcus*, изолированных из географически различных почвенных сред, были секвенированы. Размер прочитанных фрагментов  $\alpha$ -субъединиц варьировал от 302 п.н. у штамма *Rhodococcus* sp. 84 до 630 п.н. у штамма *Rhodococcus* sp. ПО28, тогда как длина целого гена  $\alpha$ -субъединицы составляет 624 п.н.. Все фрагменты имели высокое сходство с последовательностями нитрилгидратаз из базы данных GenBank (от 87 до 99%). Чаще всего такое сходство обна-

руживалось с генами штаммов *R. erythropolis* CCM2595 (JQ023030.1) и DCM13002 (AY223836). Также полученные прочтения оказались гомологичными генам железосодержащей нитрилгидратазы референтного штамма *Rhodococcus* sp. N-774 (от 84 до 96% гомологии). Длина  $\beta$ -субъединицы у представителей рода *Rhodococcus* составляет 639 п.н. Секвенированные фрагменты этого гена находились в пределах от 389 п.н. у штамма *R. erythropolis* Б20-4 до 641 п.н. у *Rhodococcus* sp. 3213. Максимально идентичными (от 94 до 99%) по этой субъединице оказались штаммы *R. erythropolis* CCM2595 (JQ023030.1), ARG-AN025 (AY223831.1) и ENG-AN033 (AY223832.1). Гомология с последовательностью штамма N-774 составила от 86 до 97%.

При переводе последовательности нуклеотидов в последовательность аминокислот оказалось, что и на этом уровне гомология исследуемых ферментов с известными ранее была очень высокой: 89–99% для  $\alpha$ -субъединицы и 87–99% – для  $\beta$ -субъединицы. Более высокая консервативность последовательности  $\alpha$ -субъединицы выявляется также при анализе дендрограмм, построенных для 21 изучаемой и 6 референтных последовательностей нитрилгидратазы (табл. 1). Здесь располагается CSLCSC-мотив, кодирующий активный центр фермента. Данный мотив идентичен у всех извест-

ных на сегодня нитрилгидратаз [Marron et al., 2012].

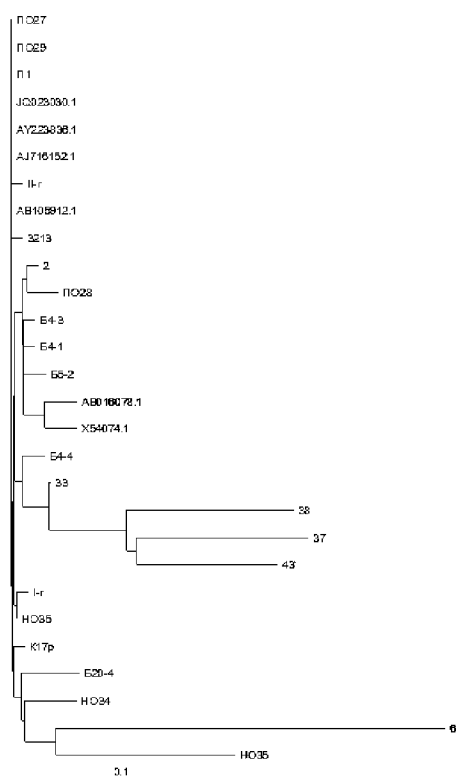
На сайте GenBank были взяты аминокислотные последовательности нитрилгидратазы разных штаммов родококков и проведено их выравнивание с помощью программы YACWGUI 1.2. относительно друг друга. Полученные аминокислотные последовательности почвенных изолятов содержали как характерные для рода *Rhodococcus*, так и уникальные замены аминокислотных остатков. Последовательность Nha содержит 3 типичных для родококков вариабельных участка: Glu 69<sup>A</sup>/Asp 69<sup>A</sup>, Val 156<sup>A</sup>/Ile 156<sup>A</sup> и Val 201<sup>A</sup>/Ile 201<sup>A</sup>. Обнаружены уникальные замены, которые не представлены в базе данных GenBank: Tyr 85 Ser у штамма Б4-4, Phe 48 Leu – 3213, Glu 49 Gln – ПО28, Pro 125 His – Б5-2, Ile 190 Val у штаммов II-г и 38.

Nhb характеризуется наличием 9 вариабельных участков: Thr 82<sup>B</sup>/Ala 82<sup>B</sup>, Glu 93<sup>B</sup>/Asp 93<sup>B</sup>, Pro 117<sup>B</sup>/Arg 117<sup>B</sup>, Glu 119<sup>B</sup>/Asp 119<sup>B</sup>, Val 125<sup>B</sup>/Ile 125<sup>B</sup>, Ser 154<sup>B</sup>/Ala 154<sup>B</sup>, Ser 158<sup>B</sup>/Thr 158<sup>B</sup>, Lys 183<sup>B</sup>/Thr 183<sup>B</sup> и Ala 185<sup>B</sup>/Asp 185<sup>B</sup>. Уникальные замены: Ile 78 Val у штамма Б5-2, Met 84 Lys и Val 85 Phe у штаммов Б20-4 и НО35, Leu 98 Pro – ПО27, Arg 128 Lys – ПО28, His 155 Arg – Б4-1, Ile 167 Val – Б4-3, Ile 167 Phe – ПО28, Ser 198 Gly – Б4-3.

Таблица 1

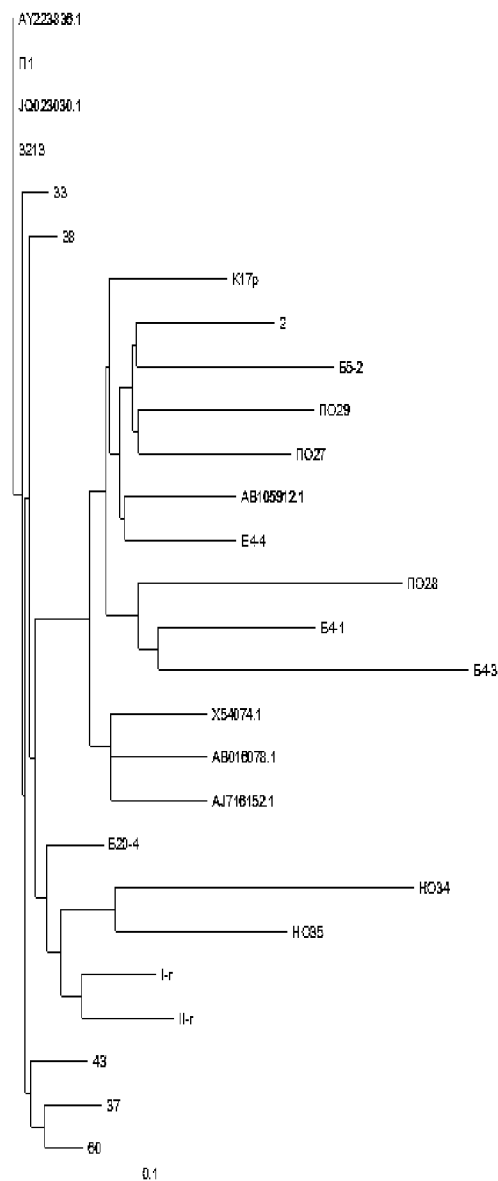
Аминокислотные замены в первичной структуре  $\alpha$ - (А) и  $\beta$ -субъединиц (Б) нитрилгидратазы

Штамм	Размер фрагмента (а.о.)	Аминокислотные замены (по отношению к <i>Rhodococcus</i> sp. N-774)
2	182	I156V, I201V
9-33	121	I156V, I201V
9-37	137	I156V
9-38	176	E69D, I156V, <b>I190V</b> , I201V
9-43 <sup>*</sup>	141	E69D, I201V
9-60	118	E69D, I156D, I201V
3213	206	<b>F48L</b> , E69D, I156V, I201V
I-г	205	E69D, I156V, I201V
II-г	205	E69D, I156V, <b>I190V</b> , I201V
Б4-1	207	I156V, I201V
Б4-3	207	I156V, I201V
Б4-4	203	E69D, <b>Y85S</b> , I156V, I201V
Б5-2	207	<b>P125H</b> , I156V, I201V
Б20-4	195	E69D, I156V, Q184R
K17p	205	E69D, I156V, I201V
НО34	168	E69D, I156V, I201V
НО35	167	E69D, I156V, I201V
П1	207	E69D, I156V, I201V
ПО27	206	E69D, I156V, I201V
ПО28	206	<b>E49Q</b> , I156V, I201V
ПО29	204	E69D, I156V, I201V



Окончание табл. 1

Б Штамм	Размер фрагмента (а.о.)	Аминокислотные замены (по отношению к <i>Rhodococcus</i> sp. N-774)
2	202	D93E, V125I, T158S
9-33	212	T82A, D93E, P117R, E119D, S154A, K183T
9-37	206	T82A, D93E, P117R, E119D, S154A, K183T
9-38	193	T82A, D93E, P117R, E119D, S154A
9-43'	206	T82A, D93E, P117R, E119D, S154A, K183T
9-60	175	T82A, D93E, P117R, E119D, S154A, K183T
3213	212	T82A, D93E, P117R, E119D, S154A, K183T
I-г	211	T82A, D93E, P117R, V118I, E119D, S154A, K183T
II-г	197	T82A, D93E, P117R, V118I, E119D, S154A, K183T
Б4-1	173	V125I, <b>H155R</b>
Б4-3	173	V125I, S154P, H155G, <b>R156K</b> , T157G, <b>I167V</b> , <b>S198G</b>
Б4-4	209	D93E
Б5-2	154	<b>I78V</b> , K87L, G88T, D93E, V125I, T158S
Б20-4	129	<b>M84K</b> , <b>V85F</b> , D93E, P117R, E119D, S154A
K17p	173	D93E, V125I
НО34	173	T82A, D93E, P117R, V118I, E119D, R156P, K183T
НО35	153	M84K, V85F, D93E, P117R, V118I, E119D, R156P, K183T
П1	211	T82A, D93E, P117R, E119D, S154A, K183T
ПО27	175	D93E, <b>L98P</b> , V125I, T158S
ПО28	171	D93E, V125I, <b>R128K</b> , H155S, <b>I167F</b>
ПО29	175	D93E, V125I, R156P, T158S



Примечание. Реконструированные последовательности сопоставлены с базой GenBank при помощи программы BLAST. Полу жирным начертанием выделены уникальные замены. Дендрограммы построены на основе сравнения аминокислотных последовательностей  $\alpha$ - и  $\beta$ - субъединиц нитрилгидратазы. Масштаб – 0.1 замена на сайт.

Аминокислотные замены могут быть локализованы не в активном центре, а в соседних регионах. Так, Nakasako et al. показали, что штамм *Rhodococcus* sp. ACV2 содержит единичную замену (Val 40 Met), расположенную на участке  $\beta$ -субъединицы, формирующей входной канал к активному центру фермента. Активность такой мутантной нитрилгидратазы отличалась от активности фермента дикого типа по оптимуму pH и скорости гидролиза циановалерамида и циановалериановой кислоты в 30 и 15 раз соответственно

[Nakasako et al., 1999]. Piersma et al. [2000] путем сайт-направленного мутагенеза получили штамм *Rhodococcus* sp. N-771 (Arg56<sup>B</sup>), фермент которого показал ограниченную стабильность и более низкую активность по сравнению со штаммом дикого типа. Данная аминокислота является консервативной для большинства известных нитрилгидратаз. Она необходима для каталитической активности, поскольку вовлечена не только в связывание субстрата, но также взаимодействует с железом в активном центре фермента [Piersma et al., 2000].

При сравнении встречаемости аминокислотных замен среди штаммов, выделенных из природных и антропогенно-измененных почв, статистически-значимой разницы не выявлено ( $p=0.717$  по F-тесту). Однако чаще замены встречались среди штаммов, выделенных из загрязненных почвенных образцов (66.7% для  $\alpha$ -субъединицы и 70.0% – для  $\beta$ -субъединицы).

Учитывая, что при молекулярном скрининге  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц нитрилгидратазы были обнаружены уникальные аминокислотные замены, представлялось интересным установить степень их консервативности и радикальности. Консервативной заменой аминокислоты называется мутация, не приводящая к значительным изменениям структуры и функции белка. В процессе эволюции консервативные замены аминокислот происходят чаще, чем радикальные. Эти замены преимущественно встречаются в функционально важных участках белковой молекулы (например, сайтах связывания лигандов). Радикальные замены аминокислот, напротив, существенно меняют структуру и функции белка [Бутвиловский, Черноус, 2008].

Для определения характера уникальных аминокислотных замен в 1966 г. предложен метод Снита. В его основе лежит анализ всех доступных для того времени физико-химических свойств аминокислот: наличие/отсутствие –ОН групп, растворимость L-изомеров, наличие бензольного кольца, свободные электроны и т.д. Поскольку достаточно сложно установить степень влияния каждого эффекта на активность белка, априори был принят равный вклад каждого эффекта в изменение биологической активности. Одним из свойств, определяющих конформацию белка, является гидрофобность составляющих его аминокислот. В 1970-е гг. Волькенштейн показал, что наиболее многочисленны и предпочтительны замены с минимальными изменениями гидрофобности аминокислотного остатка. Для оценки степени взаимоза-

меняемости аминокислот в 1976 г. А. Бачинский предложил показатель «функциональной близости аминокислот» (ФБА). Под ФБА подразумевается способность аминокислот заменять друг друга в белках с полным или частичным сохранением их активности. Величины ФБА были получены на основе анализа числа замен аминокислот в 28 семействах изофункциональных белков. Согласно представлениям Грэнтсема, частота аминокислотных замен зависит от физико-химических свойств их боковых радикалов. Формула расчета физико-химической дистанции учитывает три параметра аминокислотных остатков: полярность, объем и состав. Для удобства анализа М. Джонсон предложил использовать относительные (модифицированные) значения физико-химической дистанции. Аминокислотная замена считается консервативной при  $\phi \geq 0.416$ ,  $\Delta H < 1.28$ , ФБА  $\geq 12.4$ ,  $GD < 100$  и  $GD_M \geq 57.9$ .

В 2004 г. Х. Танг предложил новый метод определения характера аминокислотной замены – вычисление универсального эволюционного индекса (U). Он был разработан на основании анализа белок-кодирующих участков 4 383 генов, т.е. универсальный эволюционный индекс является эмпирической системой классификации аминокислотных замен по степени их эволюционной изменчивости. Чем больше значение U, тем чаще происходят взаимные замены аминокислот данной пары (индекс варьирует в пределах от 0.241 до 2.49) [Бутвиловский, Черноус, 2008].

При анализе уникальных аминокислотных замен, обнаруженных среди штаммов рода *Rhodococcus*, оказалось, что большинство из них являются консервативными. Замены Pro 125 His, Met 84 Lys, Val 85 Phe, Leu 98 Pro, His 155 Arg определяются как радикальные по двум показателям из пяти, а замена Ile 167 Phe – только по показателю функциональной близости аминокислот Бачинского (табл. 2).

Таблица 2

**Определение характера уникальных аминокислотных замен в белок-кодирующей последовательности нитрилгидратазы**

Аминокислотные замены		Показатели					
		$\phi$	$\Delta H$	ФБА	GD	$GD_M$	U
<b><math>\alpha</math>-субъединица</b>							
F 48 L	Phe 48 Leu	0.570	0.23	16	22	86	0.732
E 49 Q	Glu 49 Gln	0.685	0.45	25	29	86	1.634
Y 85 S	Tyr 85 Ser	<b>0.354</b>	<b>2.83</b>	7	<b>144</b>	59	0.503
P 125 H	Pro 125 His	<b>0.172</b>	1.20	<b>3</b>	70	64	0.784
I 190 V	Ile 190 Val	0.843	1.28	35	29	86	2.415
<b><math>\beta</math>-субъединица</b>							
I 78 V	Ile 78 Val	0.843	1.28	35	29	86	2.415
M 84 K	Met 84 Lys	0.482	0.20	<b>5</b>	95	<b>54</b>	0.559
V 85 F	Val 85 Phe	<b>0.380</b>	0.96	<b>8</b>	50	77	0.548
L 98 P	Leu 98 Pro	0.432	0.18	<b>4</b>	98	<b>54</b>	0.388
R 128 K	Arg 128 Lys	0.733	0.77	25	26	86	1.583
H 155 R	His 155 Arg	<b>0.396</b>	0.67	7	29	86	0.784

Окончание табл. 2

Аминокислотные замены		Показатели					
		$\phi$	$\Delta H$	ФБА	GD	GD <sub>M</sub>	U
R 156 K	Arg 156 Pro	0.733	0.77	25	26	86	1.583
I 167 V	Ile 167 Val	0.843	1.28	35	29	86	2.415
I 167 F	Ile 167 Phe	0.487	0.32	10	21	86	0.545
S 198 G	Ser 198 Gly	<b>0.323</b>	0.04	25	56	73	1.360

Примечание.  $\phi$  – коэффициент Снита,  $\Delta H$  – показатель Волькенштейна, ФБА – показатель Бачинского, GD – физико-химическая дистанция Грэнтсема, GD<sub>M</sub> – относительная физико-химическая дистанция Грэнтсема, U – универсальный эволюционный индекс Танга. Полу жирным начертанием выделены радикальные замены аминокислот.

Обнаруженная у штамма *R. erythropolis* Б4-4 мутация в 254 положении  $\alpha$ -субъединицы нитрилгидратазы является трансверсией (С→А) и наблюдается во втором положении кодона (ТАС→ТСС) (рисунок). Данная замена несинонимична, так как приводит к изменению кодируемой аминокислоты с тирозина на серин в 85 сайте, и определяется как радикальная по всем используемым показателям, за исключением GD<sub>M</sub>. Универсальный эволюционный индекс Танга U=0.503 отражает редкость такой замены.

```
(1) 61  CTTCGAGGAGGACTTCAGTCCAAAGGCGCGGAGCGGAAATTGGTCGCGCGGGCTTGGACCGA 120
      |||
(2) 141  CTTCGAGGAGGACTTCAGTCCAAAGGCGCGGAGCGGAAATTGGTCGCGCGGGCTTGGACCGA 200
      |||
(1) 121  CCCCAGATTCCGGGCACTGCTCTCAACGACGGTACCAGCGGGTTGCCAGTCCGGATA 180
      |||
(2) 201  CCCCAGATTCCGGGCACTGCTCTCAACGACGGTACCAGCGGGTTGCCAGTCCGGATA 260
      |||
(1) 181  TCTGGGCCCCAGGGCGAATACATCGTGGCAGTCGAAGACACCCCGACCCCTCAAGAACCT 240
      |||
(2) 261  TCTGGGCCCCAGGGCGAATACATCGTGGCAGTCGAAGACACCCCGACCCCTCAAGAACCT 320
      |||
```

Участок выровненной секвенированной последовательности гена, кодирующего  $\alpha$ -субъединицу нитрилгидратазы:

1 – полученный сиквенс *nha* штамма *R. erythropolis* Б4-4, 2 – участок *nha* штамма *R. erythropolis* ARG-AN025, AY223831.1

## Заключение

Нитрилгидратазы родококков характеризуются высокой гомологией первичной структуры, однако их активность и субстратная специфичность могут существенно отличаться даже при наличии точечных мутаций. Анализ секвенированных генов железосодержащих нитрилгидратаз почвенных штаммов рода *Rhodococcus* не выявил различий в областях, кодирующих активные или регуляторные центры ферментов. Однако в первичной структуре белков обнаружено множество как характерных, так и уникальных для данного рода аминокислотных замен, что также может повлиять на активность ферментов. Несмотря на то, что встречаемость аминокислотных замен в субъединицах нитрилгидратаз не различалась у штаммов, выделенных из природных и антропогенно-измененных почв, тем не менее, у последних выявлена большая гетерогенность фермента. Единственная замена, определенная нами как радикальная, обнаружена в последовательности  $\alpha$ -субъединицы нитрилгидра-

тазы штамма *R. erythropolis* Б4-4, изолированного из почвы предприятия по производству акриламида.

## Библиографический список

- Бачинский А.Г. Структура и помехоустойчивость генетического кода // Общая биология. 1976. Т. 37. С. 163–173.
- Бутвиловский А.В., Черноус Е.А. Методы определения характера аминокислотных замен: учеб.-метод. пособие. Минск: БГМУ, 2008. 28 с.
- Волькенштейн М. Общая биофизика. М.: Наука, 1978. 590 с.
- Гловер Д. Клонирование ДНК. Методы. М.: Мир, 1988. 538 с.
- Asano Y., Tani Y., Yamada H. A new enzyme «nitrile hydratase» which degrade acetonitrile in combination with amidase // Agricultural and biological chemistry. 1980. Vol. 44. P. 2251–2252.
- Brandao P.F.B., Clapp J.P., Bull A.T. Discrimination and taxonomy of geographically diverse strains of nitrile-metabolising actinomycetes using chemometric and molecular sequencing techniques // Environmental Microbiology. 2002. Vol. 4. P. 262–276.
- Brandao P.F.B., Clapp J.P., Bull A.T. Diversity of nitrile hydratase and amidase enzyme genes in *Rhodococcus erythropolis* recovered from geographically distinct habitats // Applied and Environmental Microbiology. 2003. Vol. 69, № 10. P. 5754–5766.
- Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution // Science. 1974. Vol. 185. P. 862–864.
- Holtze M.S. et al. Microbial degradation of the benzonitrile herbicides dichlobenil, bromoxynil and ioxynil in soil and subsurface environments—insights into degradation pathways, persistent metabolites and involved degrader organism // Environmental Pollution. 2008. Vol. 154, № 2. P. 155–158.
- Marron A.O., Akam M., Walk G. Nitrile hydratase genes are present in multiple eukaryotic supergroups // PLoS ONE. 2012. Vol. 7. P. 1–10.

- Mukram I. et al. Isolation and identification of a nitrile hydrolyzing bacterium and simultaneous utilization of aromatic and aliphatic nitriles // *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2015. Vol. 100. P. 165–171.
- Nakasako M. et al. Tertiary and quaternary structures of photoreactive Fe-type nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. N-771: roles of hydration water molecules in stabilizing the structures and the structural origin of the substrate specificity of the enzyme // *Biochemistry*. 1999. Vol. 38. P. 9887–9898.
- Piersma S.R. et al. Arginine 56 mutation in the beta subunit of nitrile hydratase: importance of hydrogen bonding to the non-heme iron center // *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2000. Vol. 80. P. 283–288.
- Prasad S., Bhalla T.C. Nitrile hydratases (NHases): At the interface of academia and industry // *Biotechnology Advances*. 2010. Vol. 28. P. 725–741.
- Sneath P.H.A. Relations between chemical structure and biological activity in peptides // *Journal of Theoretical Biology*. 1966. Vol. 12. P. 157–195.
- Tang H. et al. Universal evolutionary index for amino acid changes // *Molecular Biology and Evolution*. 2004. Vol. 21. P. 1548–1556.
- Verma V., Sangave P. Screening, isolation and identification of nitrilase producing bacteria from soil // *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2015. Vol. 6. P. 1950–1957.
- Yamada H., Kobayashi M. Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide // *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 1996. Vol. 60. P. 1391–1400.
- Brandao P.F.B., Clapp J.P., Bull A.T. Discrimination and taxonomy of geographically diverse strains of nitrile-metabolising actinomycetes using chemometric and molecular sequencing techniques. *Environmental Microbiology*. V. 4 (2002): pp. 262–276.
- Brandao P.F.B., Clapp J.P., Bull A.T. Diversity of nitrile hydratase and amidase enzyme genes in *Rhodococcus erythropolis* recovered from geographically distinct habitats. *Applied and Environmental Microbiology*. V. 69, № 10 (2003): pp. 5754–5766.
- Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science*. V. 185 (1974): pp. 862–864.
- Holtze M.S. et al. Microbial degradation of the benzonitrile herbicides dichlobenil, bromoxynil and ioxynil in soil and subsurface environments—insights into degradation pathways, persistent metabolites and involved degrader organism. *Environmental Pollution*. V. 154, №2 (2008): pp. 155–158.
- Marron A.O., Akam M., Walk G. Nitrile hydratase genes are present in multiple eukaryotic supergroups. *PLoS ONE*. V. 7 (2012): pp. 1–10.
- Mukram I. et al. Isolation and identification of a nitrile hydrolyzing bacterium and simultaneous utilization of aromatic and aliphatic nitriles. *International Biodeterioration and Biodegradation*. V. 100 (2015): pp. 165–171.
- Nakasako M. et al. Tertiary and quaternary structures of photoreactive Fe-type nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. N-771: roles of hydration water molecules in stabilizing the structures and the structural origin of the substrate specificity of the enzyme. *Biochemistry*. V. 38 (1999): pp. 9887–9898.
- Piersma S.R. et al. Arginine 56 mutation in the beta subunit of nitrile hydratase: importance of hydrogen bonding to the non-heme iron center. *Journal of Inorganic Biochemistry*. V. 80 (2000): pp. 283–288.
- Prasad S., Bhalla T.C. Nitrile hydratases (NHases): At the interface of academia and industry. *Biotechnology Advances*. V. 28 (2010): pp. 725–741.
- Sneath P.H.A. Relations between chemical structure and biological activity in peptides. *Journal of Theoretical Biology*. V. 12 (1966): pp. 157–195.
- Tang H. et al. Universal evolutionary index for amino acid changes. *Molecular Biology and Evolution*. V. 21 (2004): pp. 1548–1556.
- Verma V., Sangave P. Screening, isolation and identification of nitrilase producing bacteria from soil. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. V. 6 (2015): pp. 1950–1957.

## References

- Bachinskij A.G. [Structure and immunity of the genetic code]. *Obshhaja biologija*. V. 37 (1976): pp. 163–173. (In Russ.).
- Butvilovskij A.V., Chernous E.A. *Metody opredelenija haraktera aminokislotnyh zamen: ucheb.-metod. posobie* [Methods of determination of nature of amino-acid replacement]. Minsk, BGMU Publ., 2008. 28 p. (In Russ.).
- Vol'kenshtejn M. *Obshhaja biofizika* [General biophysics]. Moscow, Nauka Publ., 1978. 590 p. (In Russ.).
- Glover D. *Klonirovanie DNK. Metody* [Cloning of DNA. Methods]. Moscow, Mir Publ., 1988. 538 p. (In Russ.).
- Asano Y., Tani Y., Yamada H. A new enzyme «nitrile hydratase» which degrade acetonitrile in combination with amidase. *Agricultural and biological chemistry*. V. 44 (1980): pp. 2251–2252.

Yamada H., Kobayashi M. Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. V. 60 (1996): pp. 1391–1400.

Поступила в редакцию 11.01.2016

**Об авторах**

Максимова Анна Валерьевна, инженер  
лаборатории молекулярной микробиологии и  
биотехнологии  
ФГБУН Институт экологии и генетики микроор-  
ганизмов УрО РАН  
614081, Пермь, ул. Голева, 13; nuta-max@ya.ru;  
(342)2124476

Кузнецова Марина Валентиновна, доктор  
медицинских наук, с.н.с. лаборатории  
молекулярной микробиологии и биотехнологии  
ФГБУН Институт экологии и генетики микроор-  
ганизмов УрО РАН  
614081, Пермь, ул. Голева, 13; mar@iegm.ru

**About the authors**

Maksimova Anna Valer'evna, engineer of the  
laboratory of molecular microbiology and  
biotechnology  
Institute of Ecology and Genetics of  
Microorganism UB RAS. 13, Golev str., Perm,  
Russia, 614081; nuta-max@ya.ru; (342)2124476

Kuznetsova Marina Valentinovna, doctor of  
medicine, senior researcher of the laboratory of  
molecular microbiology and biotechnology  
Institute of Ecology and Genetics of  
Microorganism UB RAS. 13, Golev str., Perm,  
Russia, 614081; mar@iegm.ru