

УДК:577.152.34:577.151.5

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОТЕОЛІТИЧНОГО КОМПЛЕКСУ *BACILLUS SPP.*

Ястребова О.В., Коробкова К.С.

Фізико-хімічні властивості протеолітичного комплексу *Bacillus spp.*- Ястребова О.В., Коробкова К.С.- Отримано комплексний препарат екзопротеаз *Bacillus spp.* з культуральної рідини продуцента фракціонуванням сульфатом амонію та вивчено його властивості (вплив рН та температури). Встановлено, що протеолітичний комплекс *Bacillus spp.* представлений переважно кислими протеазами, які гідролізують ряд білкових субстратів: казеїн, гемоглобін та фібрин, для прояву активності потрібні іони металів.

Ключові слова: *Bacillus spp.*, позаклітинний протеолітичний комплекс, казеїнолітична, фібринолітична та гемоглобінолітична активності.

Адреса: Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, вул. Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна, тел. (044)5262309, e-mail: howk76@mail.ru

Physico-chemical properties of proteolytic complex of *Bacillus spp.*- O. V. Yastrebova, K. S. Korobkova-Complex enzymatic preparation of exoproteases of *Bacillus spp.* was obtained from cultural liquid of producer by fractionation with ammonium sulfate and its properties were studied (effect of pH and temperature to enzymes activity). It has been established that the proteolytic complex of *Bacillus spp.* is presented by acid proteases, which hydrolyse a number of protein substrates: casein, hemoglobin and fibrin. For the manifestation of their activity requires metal ions.

Key words: *Bacillus spp.*, extracellular proteolytic complex, casein, hemoglobin and fibrin activity.

Adress: Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, 154, Zabolotny Street, Kyiv, DSP D03680, Ukraine, e-mail: howk76@mail.ru.

Важливим напрямом сучасної мікробіологічної біотехнології є вивчення ферментів, оскільки суспільство не тільки продовжує, але й розширює їх використання в різних сферах своєї життєдіяльності. Перевагами застосування протеолітичних ферментів є висока каталітична активність, селективний характер дії по відношенню до субстратів і здатність прискорювати певні хімічні реакції без утворення побічних продуктів. Протеолітичні ферменти відіграють ключову роль у регуляторних механізмах обміну у людини, тварин і рослин. Вони широко застосовуються в шкіряній, парфумерній промисловості, у виробництві миючих засобів. У медичній галузі протеази використовують при виробництві живильних середовищ мікроорганізмів і органопрепаратів (церебралізін, сирепар та інш.). Крім того, їх використовують як самостійні лікарські препарати у терапії різноманітних захворювань органів травлення, серцево-судинної системи, при

гнійній хірургічній патології м'яких тканин і кісток, легень, при термічних опіках [3,4,6].

До недавнього часу основним джерелом при отриманні протеолітичних ферментів для потреб медицини залишались органи і тканини тварин. Проте виробництво ферментних препаратів тваринного походження, з ряду причин, з кожним роком скорочується. Також недоліком є те, що природна сировина може містити інфекційні агенти, проонкогени, нуклеїнові кислоти, пріони. Протеолітичні ферменти мікробного походження позбавлені цих недоліків. Висока швидкість розмноження, відсутність складнощів при очистці, довготривале зберігання ферментів без суттєвої втрати активності - все це дозволяє вважати мікроорганізми перспективними продуцентами протеолітичних ферментів [2,7,9].

Одним із важливих об'єктів сучасної біотехнології, як продуцентів біологічно активних речовин, є бактерії роду *Bacillus*, рівень активності позаклітинних протеаз у яких часто на

порядок перевищує такий у рослинних і тваринних аналогів. Важливою передумовою успішного використання препаратів протеолітичних ферментів мікроорганізмів у різних галузях виробництва насамперед є точна характеристика ферментних комплексів, які входять до їх складу. Тому пошук нових штамів бацил, що є активними продуцентами протеаз з різною специфічністю дії, залишається актуальним. Метою роботи було дослідити здатність продукувати позаклітинні протеази в залежності від умов культивування одного із штамів бацил – *Bacillus spp.* Для виявлення спектра дії ферментних препаратів, виділених з культуральної рідини, вивчали їх відношення до різних субстратів – казеїну, фібрину, гемоглобіну.

Матеріали і методи. Об'єкт дослідження було ізольовано з ґрунтового зразка і класифіковано як *Bacillus spp.*

Культивування бацил проводили періодичним способом у колбах Ерленмейера з робочим об'ємом 100 мл протягом 48 год на качалці зі швидкістю перемішування 220 об/хв при температурі 30°, 37°, 42°C на рідких поживних середовищах такого складу (г/л): середовище мінеральне: $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ – 1,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,75; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; желатина – 10,0; дріжджовий автолізат – 0,15; рН – 7,0; середовище Гаузе (г/л) : бульйон Хоттінгера – 30,0 мл; пептон – 5,0; NaCl – 5,0; рН середовища – 6,8. Дослідні зразки змішували один із зазначених нижче джерел вуглецю (1% до об'єму: гліцерин, мальтозу, глюкозу). Матеріалом для посіву слугувала 20-годинна культура, яку вносили в середовище в кількості 1% від об'єму. Культуральну рідину звільняли від клітин центрифугуванням при 8000 г протягом 10 хв, визначали її протеолітичну активність і використовували для отримання комплексного ферментного препарату.

Виділення ферментів із культуральної рідини проводили за допомогою фракціонування сульфатом амонію. До культуральної рідини додавали суху сіль до кінцевої концентрації 80%. Суміш витримували 24 год при 4°C, центрифугували при 5000g. Одержані препарати ліофілізували і вивчали їх ферментні властивості.

Визначення впливу рН та температури середовища на активність протеолітичного комплексу проводили в інтервалі температур від 40 до 70°C, та рН від 2,0 до 12,0 (останній створювали 0,05 М універсальним фосфатним буфером). Після закінчення часу дії на ферменти відповідного фактору, відбирали аліквоти по 1 мл і визначали активність, як описано нижче.

Загальну протеолітичну (казеїнолітичну) активність (ПА) визначали за методом Ансона в модифікації Петрової [5]. Фібринолітичну активність (ФА) визначали за розщепленням фібрину ферментним препаратом. Згусток

фібрину витримували при змішуванні 1 мл 0,9%-ного розчину фібрину і 0,1 мл 3%-ного розчину тромбіна в 0,5М трис- HCl -буфері, рН 7,5 з 0,1М NaCl . Після інкубації реакційної суміші, до якої входили згусток фібрину і 1 мл ферментного препарату (концентрація -1 мг препарату в 1 мл води) протягом 3 год при температурі 37°C, згусток фібрину, що залишився нерозчинним, розчиняли в 1 мл 0,1 М NaOH і визначали кількість білка за методом Бредфорда [8]. За одиницю фібринолітичної активності вважали таку кількість ферменту, яка каталізує гідроліз 1 мг фібрину в умовах досліду. При визначенні гемоглобінолітичної активності (ГА) як субстрат використовували гемоглобін, попередньо денатурований сечовиною (1%-ний розчин гемоглобіну обробляли 6%-ним розчином сечовини впродовж 1 год). Визначення гемоглобінолітичної активності здійснювали аналогічно методу визначення загальної протеолітичної активності. Загальну кількість вуглеводнів оцінювали за реакцією з фенолсірчаною кислотою [1].

Для статистичної обробки отриманих показників використовували комп'ютерні програми – прикладний пакет Microsoft Excel 2000 та Sigma Stat 2.0.

Результати та обговорення. Відомо, що біосинтетична активність бактерій значною мірою залежить від зовнішніх факторів, таких як склад живильного середовища, природа і концентрація джерела вуглецю, а також температура культивування.

При дослідженні умов, за яких клітинами *Bacillus spp.* у середовищі культивування інтенсивно накопичуються протеолітичні ферменти, були використані мінеральне середовище і середовище Гаузе з різними джерелами вуглецю. Нами встановлено, що найоптимальнішим для накопичення екзопротеаз штамом *Bacillus spp.* виявилась глюкоза. Мальтоза і гліцерин на 35 - 42% знижують загальну протеолітичну активність *Bacillus spp.* Максимальна протеолітична активність в культуральній рідині була встановлена при вирощуванні культури на середовищі Гаузе. Тому в подальших дослідженнях властивостей екзопротеаз *Bacillus spp.* ми використовували лише середовище Гаузе з 1% глюкози як джерела вуглецю. Доведено, що одні й ті ж джерела вуглецю можуть бути індукторами синтезу протеаз для одних продуцентів і інгібіторами – для інших. В літературі це пояснюється індивідуальними фізіологічними особливостями того чи іншого мікроорганізму, а також природою синтезованого ферменту, а саме: чи є він конститутивним, чи індукційним [9].

Температура культивування є досить вагомим фактором для визначення кількісних параметрів накопичення ферментів. Для досліджуваного

представника роду *Bacillus* температура 37⁰ С виявилась оптимальною для біосинтезу позаклітинних протеаз. Дослідження протеолітичних активностей в динаміці росту культури *Bacillus spp.* показало, що найбільша загальна ПА відмічалась на першу добу вирощування продуцента.

Як відомо, більшість продуцентів мікробного походження синтезують доволі широкий спектр протеаз [4]. Тому в наступному етапі роботи потрібно було встановити спектр протеолітичної активності культуральної рідини досліджуваного штаму. Нами встановлено, що *Bacillus spp.* продукує у зовнішнє середовище протеолітичний комплекс ферментів, активний щодо білків тваринного походження: казеїну, фібрину, гемоглобіну.

З метою з'ясування, до якого типу протеїназ (кислі, нейтральні або лужні) належить виділений нами з *Bacillus spp.* протеолітичний ферментний комплекс, ми дослідили оптимум рН, за яким

виявляється максимальна ферментативна активність при гідролізі казеїну, гемоглобіну та фібрину.

Вивчення впливу рН середовища на протеолітичні активності ферментного комплексу *Bacillus spp.* показало, що препарат активний і стабільний у діапазоні рН 6,0 – 11,0. Це вказує на гетерогенність протеолітичного комплексу *Bacillus spp.*, який включає як кислі, так і лужні протеази. Нами встановлено, що оптимуми специфічних активностей (ГА, ФА) також знаходяться в широкому діапазоні рН. Найвища ферментативна активність розщеплення казеїну виявляється в зоні рН 6,0, розщеплення гемоглобіну – при рН 7,2.

Гідролітичне розщеплення фібрину відбувається при двох оптимумах рН - 6,0 і 11,0, причому активність ферменту вища при рН 6,0. Останнє свідчить про перевагу в комплексі кислій протеази (рис. 1).

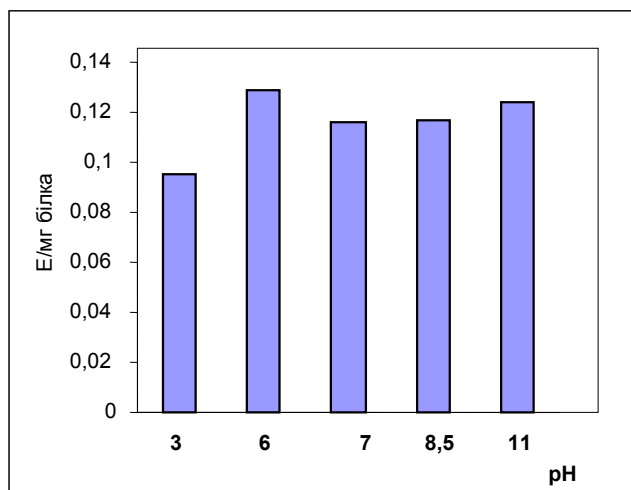


Рис.1. Гідроліз фібрину ферментним препаратом з *Bacillus spp.* при різних значеннях рН.

При вивченні залежності активності комплексного ферментного препарату *Bacillus spp.* від температури встановлено, що оптимальною температурою для гідролізу казеїну і гемоглобіну є 50⁰С, фібрину - 40-42⁰С.

Згідно даних літератури, представники роду *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. mesentericus*) продукують комерційні протеази двох типів – нейтральної (з оптимум рН ~ 7,7) та лужної (оптимум рН ~ 9,0). Кислі, нейтральні та лужні протеази, що активні в діапазоні рН від 3 до 11 і проявляють широку субстратну специфічність синтезують актиноміцети роду *Streptomyces* (*S. bradiah*, *S. griseus*, *S. fradiospiralis*) [4,9]. Таким чином, судячи з оптимумів рН,

можна припустити, що виділений нами протеолітичний ферментний препарат з *Bacillus spp.* неоднорідний, і до його складу входять, переважно, кислі протеази.

Відомо, що одним із найважливіших завдань для успішного застосування на практиці ферментів є забезпечення їх стабільності. За даними літератури, стабілізуючу дію мають аніони та катіони мінеральних та органічних солей, аніони жирних кислот тощо. Стабілізуючий вплив виявляють також продукти протеолітичного розщеплення білків, а також окремі амінокислоти [6,9]. Відомо, що існують ферменти, стабільні лише за наявності двовалентних металів. До них, насамперед,

відносяться позаклітинні ферменти мікробного походження – амілази, фосфоліпази, протеїнази та інш. Найчастіше вони містять в собі кальцій, але можуть стабілізуватися й іншими дво валентними іонами металів (магнію, стронцію, марганцю) [4]. Тому завданням наступного етапу роботи було дослідження впливу температури та катіонів кальцію на активність одержаного нами

протеолітичного комплексу з *Bacillus spp.* Для цього препарат нагрівали протягом 10 хв за наявності та відсутності катіонів кальцію при температурах 40, 50, 60, 70, 80 і 90⁰ С, після чого визначали його казеїнолітичну, гемоглобінолітичну та фібринолітичну активності.

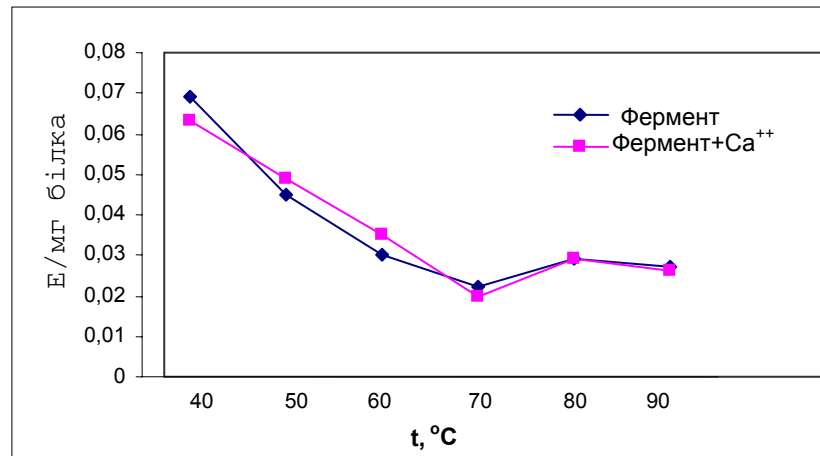


Рис.2. Казеїнолітична активність ферментного комплексу *Bacillus spp.* в присутності та за відсутності катіонів кальцію

За даними, які представлено на рис.2, видно, що катіони кальцію майже не підвищують активність ферменту. Максимальна казеїнолітична активність препарату спостерігається при 40⁰С. При нагріванні до 70⁰С за відсутності і наявності іонів кальцію активність фермента падає, хоча при 80⁰С відбувається незначне підвищення активності. Повна інактивація ферменту настає при температурі 90⁰С як за відсутності, так і наявності іонів кальцію.

Нами встановлено, що гемоглобінолітична активність виділеного ферментного препарату вища за наявності іонів кальцію без нагрівання. Нагрівання ферменту як за наявності катіонів кальцію, так і без них, знижує активність ферменту. В інтервалі температур 70–80⁰С відбувається незначне підвищення активності, при подальшому підвищенні температури спостерігається інактивація ферменту за наявності і відсутності іонів кальцію в реакційній суміші (рис.3).

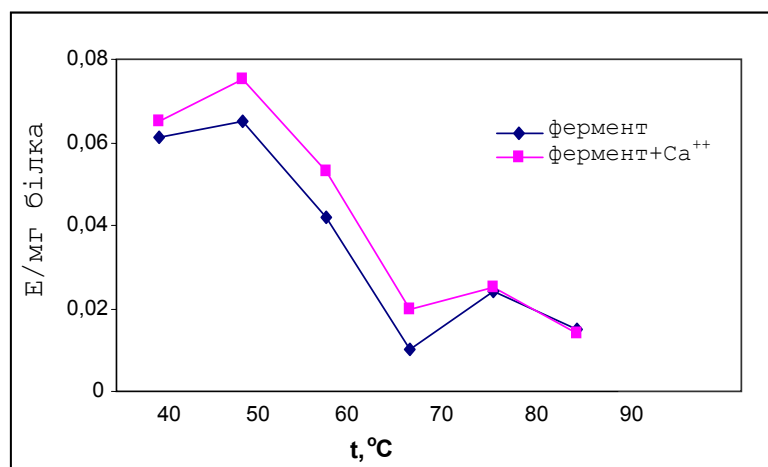


Рис.3. Гемоглобінолітична активність ферментного комплексу *Bacillus spp.* в присутності та за відсутності катіонів кальцію

Результати дослідження впливу катіонів кальцію на фібринолітичну активність ферментного комплексу виявились досить несподіваними. Встановлено, що наявність в реакційній суміші катіонів кальцію за температури 40⁰С знижує активність ферменту. При нагріванні до 50⁰С активність препарату за відсутності іонів кальцію дещо підвищується,

потім спостерігається різке падіння активності (60⁰С), а при 70⁰С препарат зовсім інактивується. При нагріванні за наявності катіонів кальцію фібринолітична активність збільшується, досягаючи максимуму при 80⁰С, потім, при подальшому підвищенні температури прогрівання, відбувається інактивація активності препарату (рис.4).

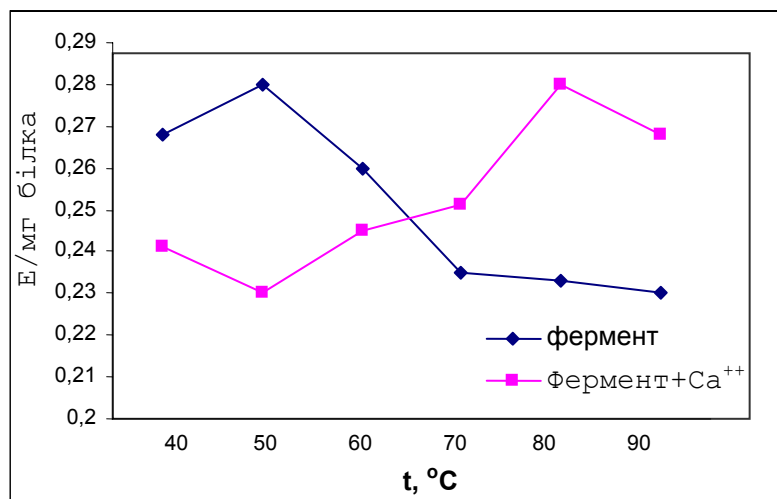


Рис.4. Фібринолітична активність ферментного комплексу *Bacillus spp.* в присутності та за відсутності катіонів кальцію

Аналізуючи отримані результати, можна зробити висновок, що позаклітинний протеолітичний комплекс штама-продуцента *Bacillus spp.* потребує катіонів кальцію для підтримки стабільності й активності. Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури відносно стабілізуючої дії катіонів кальцію щодо бактеріальних та грибних протеаз [4]. Мікроелементи також необхідні для нормального росту і розвитку бацил. Згідно даних літератури, клітинні стінки є бар'єром лише для іонів Li⁺, Ba²⁺, Co²⁺ і Al³⁺. Наявність в поживному середовищі необхідних іонів металів активує накопичення біомаси і підвищує гідролітичну

активність клітин. Недостатність іонів магнію і фосфору призводить до затримки росту клітин *B. stearotherophilus*. Біосинтез протеаз *B. subtilis* активують іони Mg²⁺, іони K⁺ стимулюють синтез β-амілази *B. cereus*, а Cu²⁺ і Zn²⁺ пригнічують їх біосинтез [6,7,9].

Таким чином, дослідження протеолітичного комплексу *Bacillus spp.* свідчать про багатокомпонентний склад цього препарату і можливість отримувати з культуральної рідини штаму *Bacillus spp.* протеолітичні ферменти з різними властивостями та субстратною специфічністю.

1. Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методи дослідження ендотоксинів. – Киев. Наук. думка, 2006. – 134 с.
2. Гатауллин А.Г. Биологические свойства штаммов *Bacillus subtilis*, перспективных для создания новых пробиотиков
3. Литвина Л.А. Экологически безопасные препараты// Проблемы сельскохозяйственной экологии. – Новосибирск. – 2000. – с. 53-54.
4. Мацелюх О.В., Левішко А.С., Варбанец Л.Д. Протеолітичні ферменти мікроорганізмів// Мікробіол. журн. – 2010. – Т. 72, №4. – с. 56-73.
5. Петрова И.С., Винцонайте М.Н. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения //Прикл. биохим. и микробиол. – 1996. – 2, №1. – С.322-327.
6. Плохинский Н.А. Математические методы в биологии. – М.: Изд. МГУ. – 1978. – 265 с.
7. Barrett A.J. Proteases//Curr. Protoc. Protein. Sci. – 2001. – Chapter 21. : Unit 21.1.
8. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding //Anal. Biochem. – 1976. – 71, № 2. – P. 248-254.
9. Sandhya C., Nampoothiri K.M., Pandey A. Microbial. Proteases// Methods in Biotechnol. – 2005. – 17. – P. 165-179.

Отримано: 11 березня 2012 р.
Прийнято до друку: 12 листопада 2012 р.