

Експериментальні праці

УДК 577.152.34:577.151.5

Н.А. Нідялкова, О.В. Мацелюх, Л.Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, ДСП, Д03680, Україна

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ФІБРИНОЛІТИЧНОЇ ПЕПТИДАЗИ *BACILLUS THURINGIENSIS* ІМВ В-7324

Дослідження фізико-хімічних властивостей фібринолітичної пептидази *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324 показало, що ензим проявляє оптимальну фібринолітичну активність при рН 10,0 і температурі 50 °С. Стабільність пептидази зберігалася в інтервалі значень рН від 6,0 до 11,0 і температури від 20 до 50 °С протягом 1 год. Пригнічення активності фібринолітичної пептидази етиленгліколь тетраоцтовою кислотою (ЕГТА) і динатрієвою сіллю етилендіамінотетраоцтової кислоти (трилон Б) свідчить про її належність до групи металопептидаз. Встановлено, що катіони Ag^+ , Mg^{2+} і Ba^{2+} підвищують фібринолітичну активність на 40 %, 25 % і 30 %, відповідно, в той час як Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} і Hg^{2+} знижують її на 30-60 %. Деякі з досліджуваних аніонів (F^- , Br^- , SO_4^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, AsO_4^{3-} , NO_3^- і NO_2^-) на 25-100 % пригнічують активність фібринолітичної пептидази *B. thuringiensis* ІМВ В-7324.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, фібринолітична пептидаза, рН- і термооптимум, металопептидази.

Пептидази з фібринолітичною дією синтезуються не лише представниками тваринного світу, але й мікроскопічними грибами та бактеріями. Найбільш розповсюдженими продуцентами фібринолітичних пептидаз є бактерії роду *Bacillus* [12]. Раніше [2, 5] нами було показано, що штам *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324 синтезує дві пептидази: 1 – з еластазою і фібринолітичною активністю і 2 – лише з фібринолітичною. Фізико-хімічні властивості пептидази 1 з еластазою активністю описані нами раніше [1].

Метою даної роботи було дослідження фізико-хімічних властивостей фібринолітичної пептидази 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження була пептидаза 2 з фібринолітичною активністю, виділена з *B. thuringiensis* ІМВ В-7324. Культивування штаму, виділення і очистку пептидази проводили як описано в роботах [4, 5].

Визначення впливу умов реакційного середовища на активність пептидази проводили в інтервалі температур від 4 до 90 °С та рН від 5,0 до 12,0. Останній створювали 0,05 М універсальним фосфатним буфером. Для визначення впливу рН і температури на стабільність ензим витримували в буфері з рН від 7,0 до 11,0 і при температурі від 20 до 70 °С, відповідно. Через 15, 30, 60 і 120 хв відбирали аліквоти (0,2 мл) для визначення залишкової фібринолітичної активності.

Вплив катіонів і аніонів в концентрації 0,001 М визначали, витримуючи фібринолітичний ензим з відповідними солями, при рН 10,0 і кімнатній температурі. Через 60 хв інкубації відбирали аліквоту 0,2 мл для визначення фібринолітичної активності. Для вивчення впливу групспецифічних реагентів застосовували наступні хімічні реагенти: фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ), дитіотреїтол (ДТТ), 1-етил-3-[3-диметиламінопропіл]карбодіїмід (ЕДК), N-етилmaleїмід (НЕМ), етиленгліколь тетраоцтова кислота (ЕГТА), динатрієва сіль етилендіамінотетраоцтової кислоти (трилон Б), L-цистеїн, *para*-хлормеркурібензоат (*n*-ХМБ) і інгібітор трипсину з сої. Ензим з реагентом (0,001 М) витримували протягом 60 хв при кімнатній температурі, після чого відбирали аліквоти (0,2 мл) для визначення залишкової активності.

Фібринолітичну активність вимірювали за методом [11], використовуючи як субстрат фібрин, отриманий із плазми крові людини на станції переливання крові. Для реакційної суміші брали 1 мг фібрину, 1,8 мл 0,01 М Трис-НСІ буфером (рН 7,5) і 0,2 мл розчину досліджуваного препарату. Інкубаційну суміш витримували 30 хв при 37 °С. Утворення продуктів розщеплення оцінювали спектрофотометрично на СФ-26 при 275 нм. За одиницю фібринолітичної активності брали таку кількість ферменту, яка підвищує оптичну густину реакційної суміші на 0,01 за 1 хвилину в умовах досліду.

© Н.А. Нідялкова, О.В. Мацелюх, Л.Д. Варбанець, 2013

На рисунках наведено середні арифметичні значення за результатами п'яти повторностей, відхилення від середнього значення не перевищувало 5 %.

Результати та їх обговорення. За літературними даними відомо [6, 8], що більшість пептидаз з фібринолітичною дією, виділених із баціл, проявляє оптимум активності в діапазоні значень рН 8,0-9,5. Визначення рН-оптимуму дії фібринолітичної пептидази *B. thuringiensis* IMB В-7324 показало (рис. 1, а), що ензим активно деградує фібрин в лужній зоні рН з оптимумом при 10,0.

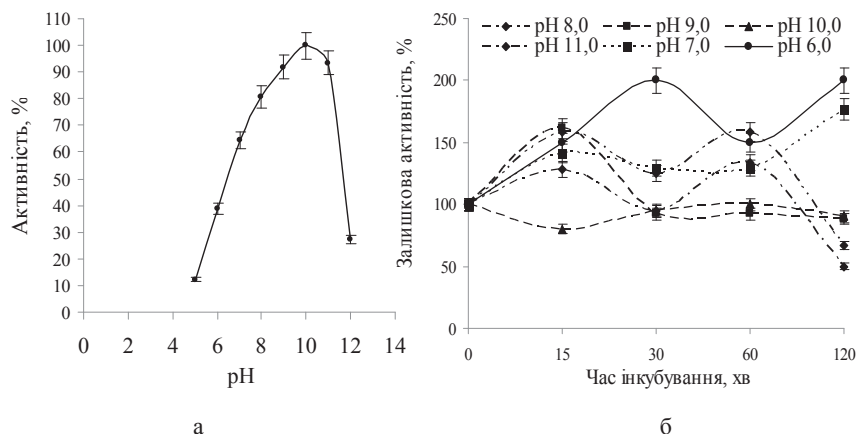


Рис. 1. рН-Оптимум (а) і рН-стабільність (б) пептидази з фібринолітичною активністю *B. thuringiensis* IMB В-7324

Вивчення стабільності фібринолітичної активності пептидази при різних значеннях рН показало (рис. 1, б), що протягом 1 год інкубації ензим стабільний в усьому досліджуваному діапазоні значень рН, а через 2 год активність його залишалася майже незмінною при рН 9,0 і 10,0. Крім того, інкубування ензиму при рН 6,0 і 7,0 приводило до збільшення фібринолітичної активності на 100 і 76 %, відповідно, порівняно з початковою активністю. Але витримування пептидази в середовищі з рН 8,0 і 11,0 протягом другої години знижувало стабільність ензиму на 50 і 35 %, відповідно. З літератури відомо [10], що оптимум рН і стабільність очищеної фібринолітичної пептидази *B. polymyxa* NRC-A з ґрунту складає 8,5 в Трис-НСІ буфері. Також відомо, що наттокіназа з *B. subtilis* K42 стабільна в інтервалі значень рН 6,0 – 10,0 [8], а фібринолітичний ензим BSF1 *B. subtilis* A26 – 7,0-12,0 [6]. Порівнюючи з іншими фібринолітичними ензимами, можна сказати, що досліджувана пептидаза стабільна в більш широкому діапазоні значень рН від 6,0 до 11,0.

Вивчення впливу температури на фібринолітичну активність досліджуваного ензиму показало (рис. 2, а), що ензим активний при досить високих температурах, а температурний оптимум його дії знаходиться при 50 °С. Показано (рис. 2, б), що фібринолітична пептидаза *B. thuringiensis* IMB В-7324 є доволі термостабільною і протягом двох год преінкубації при температурах 20, 30, 40, 50 °С її активність залишалася на рівні 100 % (40 і 50 °С) або навіть підвищувалась на 14-45 %. Преінкубація фермента при температурі 60 і 70 °С приводила до втрати 50 % від вихідної активності протягом першої год і 60-80 % протягом другої.

Таким чином, фібринолітична пептидаза *B. thuringiensis* IMB В-7324 є більш термостабільною, ніж описана в літературі [13] наттокіназа *B. subtilis* Natto В-12, при інкубації якої протягом 40 хв при 60 °С залишалася близько 70 % фібринолітичної активності, при 50 °С протягом 1 год – 80 %, а при 60 °С протягом 60 хв ензим взагалі втрачав активність.

Відомо [8, 9], що мікроорганізми роду *Bacillus*, як правило, синтезують дві групи протеаз: серинові і металопротеази. Є й такі протеази, що містять залишок серину в активному центрі, але при цьому для прояву каталітичних властивостей потребують іонів металів. Для вивчення групової належності пептидаз застосовують різноманітні низько- і високомолекулярні групоспецифічні інгібітори. Отримані нами дані показують (таблиця), що інкубування пептидази *B. thuringiensis* IMB В-7324 з хелатуючими реагентами ЕГТА і трилоном Б викликало пригнічення фібринолітичної активності на 87-90 %, що може свідчити про присутність іонів металів в активному центрі молекули ензиму, тобто його можна віднести до групи металопротеаз.

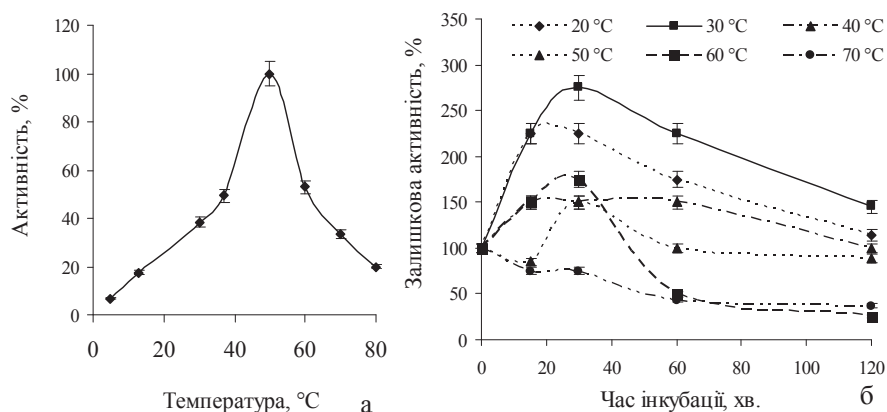


Рис. 2. Термооптимум (а) і термостабільність (б) пептидази з фібринолітичною активністю *B. thuringiensis* IMB В-7324

Таблиця

Вплив групоспецифічних реагентів на фібринолітичну активність пептидази *B. thuringiensis* IMB В-7324

Групоспецифічні реагенти	Механізм дії	Фібринолітична активність, %
Трилон Б	Хелатуючі агенти	13±0,65
ЕГТА		10±0,5
НЕМ	Тіолові реагенти	112,5±5,6
pХМБ		106,5±5,3
L-Цистеїн		88±4,4
ДТГ	Відновлюють дисульфідні зв'язки	100±5,0
ЕДК	Взаємодіє з вільними карбоксильними групами	104±5,2
ФМСФ	Інгібітори серинових пептидаз	104±5,2
Інгібітор трипсину з сої		112±5,6
Контроль		100±5,0

На активність ензиму не впливали фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) і соєвий інгібітор трипсину, з чого можна зробити висновок, що в складі активного центру досліджуваної пептидази не міститься серин і вона не відноситься до групи серинових протеаз. Взаємодія ензиму з ЕДК, який здатний зв'язувати каталітично активні карбоксильні групи (аспарігінової або глутамінової кислот), не приводила до втрати активності, що свідчить про відсутність в складі каталітичного центру таких груп. Інгібітори, які блокують вільні SH-групи: НЕМ та nХМБ не впливали на активність пептидази, що може свідчити про відсутність каталітично активних SH-груп.

Відомо [3], що катіони і аніони можуть зв'язуватися в молекулі ензима з певними амінокислотними залишками і приводити до інгібування його активності. Встановлено (рис. 4), що додавання катіонів Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} і Hg^{2+} приводило до зниження фібринолітичної активності на 30-60 %. Відомо, що Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} і Hg^{2+} можуть зв'язуватися із вільними SH-групами білкової молекули, але оскільки каталітично активних SH-груп в молекулі фібринолітичної пептидази *B. thuringiensis* IMB В-7324 нами не було виявлено, така дія цих катіонів може бути пов'язана або з конформаційними змінами молекули білка, або впливом їх на зв'язування з субстратом.

Катіони NH_4^+ , Mg^{2+} , Co^{2+} і Ba^{2+} активували ензим на 15-40 %, що може свідчити про сприяння цих іонів в утворенні ензим-субстратного комплексу. За даними літератури інгібуючий вплив Cu^{2+} відомий також для фібринолітичних ензимів *B. amyloliquefaciens* CH51 [9] і *B. subtilis* Natto В-12 [13]. Mg^{2+} як активатор здатен впливати на металопептидазу *B. subtilis* K42, а Ba^{2+} – на фібринолітичний ензим *B. subtilis* K42 [8].

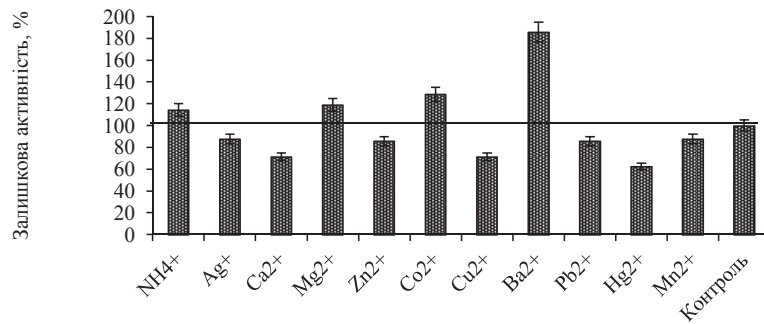


Рис. 4. Вплив катіонів металів (у вигляді хлоридів) на фібринолітичну активність пептидази *B. thuringiensis* IMB B-7324

Вивчення впливу аніонів на фібринолітичну активність пептидази *B. thuringiensis* IMB B-7324 показало (рис. 5), що аніони F⁻, Br⁻, SO₄²⁻, S₂O₃²⁻, AsO₄³⁻, NO₃⁻ і NO₂⁻ інгібують фібринолітичну активність досліджуваного ензиму на 25-100 %. Це можна пояснити тим, що під час взаємодії аніонів з ензимами відбувається руйнування водневих зв'язків, які стабілізують структуру білка [7]. Проте, аніони Cl⁻, I⁻, CH₃COO⁻, HPO₄²⁻, CO₃²⁻, SO₃²⁻, навпаки, активували пептидазу на 25-114 %.

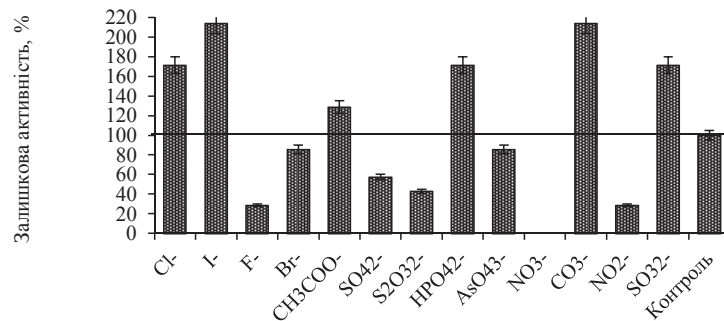


Рис. 5. Вплив аніонів (у вигляді солей калію або натрію) на фібринолітичну активність пептидази *B. thuringiensis* IMB B-7324

Таким чином, показано, що:

1. фібринолітична пептидаза *B. thuringiensis* IMB B-7324 є металопептидазою;
2. рН- і термооптимум дії ензиму знаходиться при 9,0 і 50 °С, а рН- та термостабільність при 6,0-11,0 і 20-50 °С, відповідно.

Н.А. Нудялкова, Е.В. Мацелюх, Л.Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ ПЕПТИДАЗЫ *BACILLUS THURINGIENSIS* IMB B-7324

Резюме

Исследование физико-химических свойств фибринолитической пептидазы *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 показало, что она проявляет оптимальную фибринолитическую активность при рН 10,0 и температуре 50 °С. Стабильность пептидазы сохранялась в интервале значений рН от 6,0 до 11,0 и температуры от 20 до 50 °С в течение 1 ч. Угнетение активности фибринолитической пептидазы этиленгликоль тетрауксусной кислотой (ЭГТА) и динатриевой солью этилендиаминотетрауксусной кислоты (трилон Б) свидетельствует о принадлежности её к группе металlopeптидаз. Установлено, что катионы Ag⁺, Mg²⁺ и Ba²⁺ повышают фибринолитическую активность на 40 %, 25 % и 30 %, соответственно, в то время как Ca²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ и Hg²⁺ снижают её на 30-60 %. Некоторые из исследованных анионов (F⁻, Br⁻, SO₄²⁻, S₂O₃²⁻, AsO₄³⁻, NO₃⁻ и NO₂⁻) на 25-100 % угнетают активность фибринолитической пептидазы *B. thuringiensis* IMB B-7324.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Bacillus thuringiensis*, фибринолитическая пептидаза, рН- и термооптимум, металlopeптидазы.

N. A. Nidalkova, O. V. Matseliukh, L. D. Varbanets

Zabolotny Institute of Microbiology and Viorology, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF *BACILLUS THURINGIENSIS* IMV B-7324 FIBRINOLYTIC PEPTIDASE

S u m m a r y

Investigations of physico-chemical properties of the *Bacillus thuringiensis* IMV B-7324 fibrinolytic peptidase showed that optimal activity of enzyme displayed at pH 10.0 and temperature 60 °C. Stability of peptidase retained in the range of pH from 6.0 to 11.0 and temperature from 20 to 50 °C over 1 h. Inhibition of fibrinolytic peptidase activity by ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) and tetrasodium salt of ethylenediaminetetraacetic acid (trilon B) indicates the belonging of this enzyme to the group of metallopeptidases. It was established that cations Ag⁺, Mg²⁺ and Ba²⁺ increased the fibrinolytic activity by 40 %, 25 % and 30 %, respectively, but Ca²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ and Hg²⁺ reduced it by 30-60%. Several of studied anions (F⁻, Br⁻, SO₄²⁻, S₂O₃²⁻, AsO₄³⁻, NO₃⁻ and NO₂⁻) inhibit the activity of *B. thuringiensis* IMV B-7324 fibrinolytic peptidase by 25-100%.

The paper is presented in Ukrainian.

К e y w o r d s: *Bacillus thuringiensis*, fibrinolytic peptidase, pH- and thermo optimum, metallopeptidase.

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s: Nidalkova N.A., Zabolotny Institute of Microbiology and Viorology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Мацелюх О.В., Нідялкова Н.А., Варбанець Л.Д. Очистка і фізико-хімічні властивості пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 з еластазою і фібринолітичною активністю // Укр. біохім. журн. – 2012. – **84**, № 6. – С. 25–36.
2. Мацелюх О.В., Нідялкова Н.А., Варбанець Л.Д. Особливості росту і біосинтезу еластази мутантним варіантом *Bacillus* sp. 27-88ELS⁺ // Біотехнологія. – 2011. – **4**, № 3. – С. 43–50.
3. Муғинова С.В., Галимова А.З., Поляков А.Е., Шеховцова Т.Н. Ионные жидкости в ферментативном катализе и биохимических методах анализа: возможности и перспективы // Журн. аналит. химии. – 2010. – **65**, № 4. – С. 341–362.
4. Нідялкова Н.А., Мацелюх О.В., Варбанець Л.Д. Виділення фібринолітичної пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 // Мікробіол. журн. – 2012. – **74**, № 5. – С. 9–15.
5. Нідялкова Н.А., Мацелюх О.В., Варбанець Л.Д. Оптимізація середовища для синтезу фібринолітичної пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 // Біотехнологія. – 2012. – **5**, № 4. – С. 74–81.
6. Agrebia R., Haddara A., Hmideta N., Jelloulia K., Mannia L., Nasri M. BSF1 fibrinolytic enzyme from a marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: Purification, biochemical and molecular characterization // Process Biochem. – 2009. – **44**, N 11. – P. 1252–1259.
7. Bilanicová D., Salis A., Ninham B.W., Monduzzi M. Specific anion effects on enzymatic activity in nonaqueous media // J. Phys. Chem. B. – 2008 – **112**, N 38. – P. 12066–12072.
8. Hassanein W.A., Kotb E., Awmy N.M., El-Zawahry Y.A. Fibrinolysis and anticoagulant potential of a metallo protease produced by *Bacillus subtilis* K42 // J. Biosci. – 2011. – **36**, N 5. – P. 773–779.
9. Kim G.M., Lee A.R., Lee K.W., Park J.Y., Chun J., Cha J., Song Y.S., Kim J.H. Characterization of a 27 kDa fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* CH51 isolated from Cheonggukjang // J. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – **19**, N 9. – P. 997–1004.
10. Maal K.B., Emtiaz G., Nahvi I. Increasing the alkaline protease activity of *Bacillus cereus* and *Bacillus polymyxa* simultaneously with the start of sporulation phase as a defense mechanism // Afr. J. Biotechnol. – 2011. – **10**, N 19. – P. 3894–3901.
11. Masada M. Determination of the thrombolytic activity of Natto extract // Food style. – 2004. – **8**, N 1. – P. 92–95.
12. Peng Y., Yang X., Zhang Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – **69**, N 2. P. 126–132.
13. Wang C., Du M., Zheng D., Kong F., Zu G., Feng Y. Purification and characterization of nattokinase from *Bacillus subtilis* Natto B-12 // J. Agric. Food Chem. – 2009. – **57**, N 20. – P. 9722–9729.

Отримано 19.11.2012