

**Л.Д. Варбанець, О.В. Мацелюх, К.В. Авдіюк, О.В. Гудзенко,
Н.А. Нідялкова, В.О. Романовська, О.Б. Таширев**

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

ГІДРОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ, ВИДІЛЕНИХ З ЕКОСИСТЕМ УЗБЕРЕЖЖЯ МЕРТВОГО МОРЯ

*Досліджені штами характеризувались загальною протеолітичною (казеїнолітичною) активністю, в той час як еластазна активність виявлена лише у двох штамів *Gracilbacillus* 6m2 і 7m1, причому вона була дуже високою і складала 23,1 і 34,7 Од/мл, відповідно, що знаходиться на рівні активності описаних в літературі бактеріальних продуцентів: *Vacillus mesentericus* 316 M (6 Од/мл), *Vacillus thuringiensis* ІМВ В-7324 (50-55 Од/мл). Здатність обох досліджуваних штамів синтезувати фермент, активний щодо еластину, є дуже важливою, з огляду на можливість його застосування в медичній практиці, оскільки еластази здатні до дисоціації еластинових волокон сполучних тканин. Поряд із цим штами проявляли також і фібринолітичну активність, але вона була незначною. Шість із восьми досліджених штамів проявили амілазну активність від 0,01 до 1,173 Од/мл, але ні один із досліджуваних штамів, представників різних екосистем узбережжя Мертвого моря, не проявляв α -L-рамнозидазної активності.*

Ключові слова: мікроорганізми екосистем узбережжя Мертвого моря, пептидазна, α -L-рамнозидазна, α -амілазна активності.

На сьогодні ферменти широко використовуються в різних біотехнологіях, зокрема у виробництві продуктів харчування і напоїв, хімічній промисловості, фармакології, медицині тощо. Більшість ферментів, які знайшли практичне застосування, було виявлено і виділено з організмів (тварин, грибів, рослин, а також мезофільних мікроорганізмів), які існують при нейтральних (в нашому розумінні) умовах. Тим не менш, незважаючи на корисні властивості ферментів, виділених із мікроорганізмів, їх використання може бути обмежено їх нестабільністю в екстремальних умовах (максимальних або мінімальних значеннях температури та рН, високому рівні солоності), які можуть виникати в різних технологічних процесах. З огляду на це, екстремофільні мікроорганізми викликають неабияку увагу вчених з погляду вивчення їх адаптації до екстремальних умов довкілля та використання їх як продуцентів у біотехнологічних процесах для синтезу біологічно активних речовин. Оскільки синтезовані екстремофілами ферменти можуть проявляти підвищену активність, стабільність, а також стійкість до екстремальних факторів, то це дає можливість використання їх для розробки нових біотехнологій в медицині, косметології, харчовій промисловості. Поряд із цим, завдяки змінам у структурі ферментів, які можуть обумовити екстремофілію їх продуцентів, деякі екстремофіли, зокрема представники архей, можуть реалізувати унікальні метаболічні шляхи, і завдяки цьому можуть бути продуцентами ферментів з новими властивостями.

Раніше авторами [5] були виділені мікроорганізми з екосистем узбережжя Мертвого моря, вивчена їх стійкість до деяких екстремальних факторів і показано, що вони є помірними галофілами, термотолерантними і резистентними до високих доз УФ опромінення. У зв'язку з цим метою даної роботи було вивчити здатність ізольованих мікроорганізмів продукувати по-заклітинні гідролази, а саме: пептидази, α -L-рамнозидази і α -амілази – ферменти, які широко використовуються в різних галузях промисловості і медицини.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень було 8 штамів мікроорганізмів, виділених з екосистем узбережжя Мертвого моря (табл. 1).

Для визначення ферментативної активності мікроорганізми вирощували на рідких середовищах різного складу: (1) середовище для продуцентів α -L-рамнозидаз (г/л): NaNO_3 -2, KH_2PO_4 -1, KCl -0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,015, рамноза – 3; (2) для продуцентів амілаз – теж саме середовище, але з використанням нерозчинного крохмалю (10 г/л), як джерела вуглецевого живлення; (3) для продуцентів пептидаз – (г/л): KH_2PO_4 – 1,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,75; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; мальтоза – 1,0; желатин – 10,0; дріжджовий автолізат – 0,15, рН – 6,5-6,7.

© Л.Д. Варбанець, О.В. Мацелюх, К.В. Авдіюк, О.В. Гудзенко, Н.А. Нідялкова, В.О. Романовська, О.Б. Таширев, 2014

Характеристика екосистем узбережжя Мертвого моря, з яких були ізольовані мікроорганізми

№№ зразків	Екосистема	№№ ізольованих штамів
1	Кліф навколо Мертвого моря, який складається із каміння, зцементованого глиною, що містить 5-10 г органічної речовини/кг	1т2, 1т3, 1т4, 1т5
6	Поверхневий шар солоного ґрунту, зразки відібрано біля струмка, який тече через глинисто-соляну рівнину в бік Мертвого моря	6т1, 6т2,
7	Чорна високо мінералізована грязь, зразки відібрано біля струмка. Представляє собою високодисперсну колоїдну речовину, пластичну на дотик. Використовується як лікувальна грязь	7т1, 7т3

Культури вирощували 2-3 доби при 42°C на качалках (220 об/хв) в колбах Ерленмейера (750 мл), які містили 100 мл середовища (для біосинтезу α -L-рамнозидази та пептидаз) або у великих пробірках, які містили 10 мл поживного середовища (для біосинтезу α -амілаз). Ферментативну активність визначали в супернатанті культуральної рідини.

Для визначення рамнозидазної активності до 0,1 мл супернатанту культуральної рідини додавали 0,2 мл 0,1 М фосфатно-цитратного буферу (ФЦБ) рН 5,2 і 0,1 мл 0,01 М розчину субстрата - *n*-НФ-L-рамнопіранозиду. Реакційну суміш інкубували в стандартних умовах досліду (10 хв, 37°C). Реакцію зупиняли додаванням 2 мл 1 М розчину бікарбонату натрію. В контроль додавали ті ж компоненти, але в зворотному порядку. Кількість *n*-нітрофенола, що відщепився від субстрату в результаті гідролізу, визначали колориметричним методом при 400 нм. За одиницю активності α -L-рамнозидази брали кількість ферменту, що гідролізує 1 мкмоль нітрофенільного субстрату за хвилину в умовах досліду [6].

Визначення амілолітичної активності здійснювали згідно з ГОСТом 20264.4-89, для цього у пробірці наливали по 2 мл 1%-го розчину крохмалю (субстрату), інкубували у термостаті (10 хв, 37°C). Не виймаючи пробірки з термостата, в одну з них додавали 1 мл дистильованої води (контрольна), в інші – 1 мл супернатанту культуральної рідини (дослідна). Суміші швидко перемішували і витримували у термостаті (10 хв). З кожної пробірки почергово відбирали по 0,1 мл розчину і переносили у пробірки, в які налито по 10 мл робочого розчину йоду. Вміст пробірок перемішували і через 5-10 хв визначали оптичну густину розчину колориметричним методом за 670 нм у кюветах з товщиною шару розчину 10 мм. Контрольним розчином слугувала дистильована вода. За одиницю активності брали таку кількість ферменту, що за температури 37 °C і рН 6,0 за 10 хв каталізує розщеплення до декстринів 1 г крохмалю.

Загальну пептидазну (казеїнолітичну) активність визначали за методом Ансона в модифікації Петрової [4], який базується на кількісному визначенні тирозину і триптофану, що утворюються при ензиматичному гідролізі казеїну під дією досліджуваних ферментів. За одиницю активності брали таку кількість ферменту, яка каталізує гідроліз білка зі швидкістю 1 мкмоль тирозину за 1 хв в прийнятих умовах до продуктів, що не осаджуються трихлороцтовою кислотою. Фібринолітичну активність вимірювали за методом [8], використовуючи фібрин як субстрат. За одиницю фібринолітичної активності брали таку кількість ферменту, яка підвищує оптичну густину реакційної суміші на 0,01 за 1 хвилину в умовах досліду. Еластазну активність визначали колориметрично за інтенсивністю забарвлення розчину при ферментативному гідролізі конго-рот еластину [9]. За одиницю активності брали кількість ферменту, яка каталізує гідроліз 1 мг субстрату за хв в стандартних умовах.

Білок визначали методом Lowry et al. [7].

Усі досліди проводили в трьох повторях, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3-5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за алгоритмом, описаним у роботі [10]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значущості $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Мікроорганізми було ізольовано із зразків, які відбирали в екосистемах узбережжя Мертвого моря (Ізраїль), зокрема на кліфах, які представляють собою вертикальні обриви висотою 100-150м, що часею оточують Мертве море, а також з глинисто-соляної рівнини на його узбережжі. Раніше авторами [5] було ідентифіковано 8 шта-

мів, які домінували в досліджених зразках. Всі штами були аеробними, хемоорганотрофними, термотолерантними, помірно галофільними бактеріями, які за морфолого-фізіологічними властивостями подібні видам *Gracilibacillus halotolerans*, *Salimicrobium album* та штамам *Caryophanon*. Декілька штамів *G. halotolerans* проявляли значну антагоністичну дію щодо умовно-патогених культур *Staphylococcus aureus* 209 р і *Candida albicans* УКМ У-690.

Оскільки одержані штами є новими представниками екстремофільних прокариот, вивчали їх здатність синтезувати такі позаклітинні ферменти як пептидази, α -L-рамнозидази і амілази (табл. 2).

Таблиця 2

Гідролітична активність штамів з різних екосистем узбережжя Мертвого моря

№ штаму	α - Амілазна активність, Од/мл	α -L-Рамнозидазна активність, Од/мл	ПА, Од/мл (2 доба)	ЕА, Од/мл	ФА, Од/мл
1т5	0,134±0,007	-	0,01±0,0005	-	-
6т1	0	-	0,01±0,0005	-	-
7т1	0,05±0,0025	-	0,036±0,0018	34,7±1,74 (3 доба)	0,5±0,025 (3 доба)
1т2	0,03±0,0012	-	0,005±0,00025	-	-
6т2	0	-	0,021±0,001	23,1±1,16 (2 доба)	0,33±0,016 (3 доба)
1т3	0,278±0,013	-	0,01±0,0005	-	-
7тк3	1,173±0,05	-	0,026±0,001	-	-
1т4	0,01±0,0005	-	0,01±0,0005	-	-

Примітка: ПА – протеолітична активність, ЕА – еластазна активність, ФА – фібринолітична активність, « - » відсутність активності

Несподіваними виявились результати щодо відсутності здатності всіх досліджених штамів проявляти α -L-рамнозидазну активність (табл. 2). Раніше [1] при вивченні 64 штамів бактерій, виділених із води і безхребетних Чорного моря, було встановлено, що 64 % досліджуваних штамів проявляли здатність синтезувати ферменти з α -L-рамнозидазною активністю. Подібно до чорноморських видів бактерій представники екосистем узбережжя Мертвого моря проявляли загальну протеолітичну (казеїнолітичну) активність. Еластазна активність була виявлена лише у двох штамів *Gracilibacillus* 6т2 і 7т1, причому вона була дуже високою і складала 23,1 і 34,7 Од/мл, відповідно (табл. 2), що знаходиться на рівні активності описаних в літературі бактеріальних продуцентів: *Bacillus mesentericus* 316 М (6 Од/мл) [2], *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324 (50-55 Од/мл) [3]. Здатність двох досліджуваних штамів синтезувати фермент, активний щодо еластину, є дуже важливою, тому що мікробний фермент може бути перспективним для застосування в медичній практиці, оскільки еластатні до дисоціації еластिनних волокон сполучних тканин. На сьогодні в промисловому виробництві є тільки панкреатична еластаза, а продуценти еластази мікробного походження поки що не використовуються. Ці два штами проявляли також і фібринолітичну активність, але вона була незначною.

Встановлено (табл. 2), що шість із восьми досліджених штамів проявили амілазну активність від 0,01 до 1,173 Од/мл.

Результати проведених досліджень дають підстави припустити, що для подальших досліджень три із досліджених штамів *Gracilibacillus* можуть бути використані як продуценти: амілази (7тк3) та еластази (7т1 і 6т2). З екологічного погляду певну увагу привертає той факт, що найбільш активні продуценти амілази (7тк3) та еластази (7т1) ізольовано саме із лікувальної грязі Мертвого моря. Відомо, що чорна високомінералізована грязь Мертвого моря має цілющі властивості та широко використовується для лікування запальних процесів (поліартритів тощо), шкірних патологій (екзема, псоріаз, нейродерміт) тощо. Тож подальше дослідження ферментів штамів *Gracilibacillus* можна вважати перспективним.

Оскільки продуценти ферментів вирощували при підвищеній температурі – 42 °С, а активність проявлялась при 37 °С, такі ферменти можна вважати термозимами. Вони характеризуються рядом біотехнологічних переваг перед мезофільними аналогами: проходження ферментативних реакцій при високих температурах дозволяє працювати з більш високими

концентраціями субстрата завдяки зниженню в'язкості розчину і підвищенню коефіцієнтів дифузії при високих температурах; термостабільні ферменти часто проявляють підвищену стійкість до денатуруючих агентів (наприклад, розчинників, детергентів); знижується ризик побічних процесів, так як більшість мікроорганізмів, здатних проявляти небажану дію, гинуть при температурах більших ніж 70 °С. Крім того, спрощується очистка термозимів, порівняно з клонованими і експресованими в мезофільних мікроорганізмах, від решти білків клітин хазіяїна завдяки можливості проведення термообробки, при якій багато мезофільних мікроорганізмів денатурують.

Оскільки області використання гідролаз, такі як текстильна і паперова промисловість, які в останні роки виходять на передній план переробки відходів різного походження, постійно розвиваються і розширюються, існує потреба в нових гідролазах, більш ефективних, ніж існуючі, і з новими властивостями. Разом із тим, дослідження філогенетичного різноманіття мікроорганізмів у термальних екосистемах свідчать, що більшість термофільних мікроорганізмів на сьогодні не одержано в лабораторних культурах і тому їх властивості невідомі. Серед нових термофільних прокариот можуть бути і організми з новими, біотехнологічно кращими властивостями. Тому знайдені нами нові представники екстремофілів з такими гідролітичними активностями, як пептидазні і α -амілазні є цінними як з наукового, так і з практичного погляду.

*Л.Д. Варбанец, Е.В. Мацелюх, Е.В. Авдиюк, А.В. Гудзенко,
Н.А. Нидялкова, В.О. Романовская, А.Б. Таширев*

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

ГИДРОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИБРЕЖНЫХ ЭКОСИСТЕМ МЕРТВОГО МОРЯ

Резюме

Исследуемые штаммы характеризовались общей протеолитической (казеинолитической) активностью, в то время как эластазная активность выявлена только у двух штаммов *Gracilibacillus* 6т2 и 7т1, причем она была очень высокой и составляла 23,1 и 34,7 Е/мл, соответственно, что находится на уровне активности описанных в литературе бактериальных продуцентов: *Bacillus mesentericus* 316 М (6 Е/мл), *Bacillus thuringiensis* IMB В-7324 (50-55 Е/мл). Способность двух исследованных штаммов синтезировать фермент, активный по отношению к эластину, является важной, поскольку микробный фермент может быть перспективным для использования в медицинской практике: эластазы способны к диссоциации эластиновых волокон соединительных тканей. Эти два штамма проявляли также и фибринолитическую активность, однако она была незначительной. Шесть из восьми исследованных штаммов проявили амилазную активность от 0,01 до 1,173 Е/мл. Установлено, что ни один из исследованных штаммов, представителей прибрежных экосистем Мертвого моря, не способен проявлять α -L-рамнозидазную активность.

Ключевые слова: микроорганизмы прибрежных экосистем Мертвого моря, пептидазная, α -L-рамнозидазная, α -амилазная активности.

*L.D. Varbanets, O.V. Matseliukh, K.V. Avdiyuk, A.V. Gudzenko,
N.A. Nidialkova, V.O. Romanovskaya, O.B. Tashyrev*

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

HYDROLYTIC ACTIVITY OF MICROORGANISMS OF THE DEAD SEA COASTAL ECOSYSTEMS

S u m m a r y

All strains tested are characterized by proteolytic (caseinolytic) activity, while elastase one was revealed only in two *Gracilibacillus* strains 6т2 and 7т1. The activity was high enough (23.1 and 34.7 Е/мл, respectively). These values are at the level of bacterial producers which are described in literature: *Bacillus mesentericus* 316

M (6 E/ml), *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 (50-55 E/ml). The ability of two strains tested to synthesize enzyme, active against elastine, is important, so far as microbial enzyme may be perspective for using in medicine: elastases are able to dissociation of elastin fibres of connective tissues. These two strains display also fibrinolytic activity, however it was insignificant. Six of eight strains studied manifested α -amylase activity (0.01 – 1.173 E/ml). It was shown that no strains, isolated from the Dead Sea costal ecosystems are able to manifest α -L-rhamnosidase activity.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у в о р д с: microorganisms of the Dead Sea costal ecosystems, peptidase, α -L-rhamnosidae, α -amylase activity.

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s: *Varbanets L.D.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Варбанец Л.Д., Авдеева Л.В., Борзова Н.В., Мацелюх Е.В., Гудзенко А.В., Киприанова Е.А., Ярошенко Л.В. Бактерии Черного моря – продуценты гидролитических ферментов // Микробиол. журн. – 2011. – 73, №5. – С.9–15.
2. Колтукова Н.В., Бондарчук А.А., Захарова И.Я. Разделение, очистка и некоторые свойства протеиназ *Bacillus mesentericus* // Там же. – 1982. – 44, №3. – С. 12–15.
3. Мацелюх О.В., Варбанец Л.Д., Іваниця В.О. Штам бактерії *Bacillus thuringiensis* – продуцент позаклітинної еластази//Патент на винахід №97906, зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на винаходи 26.03.2012.
4. Петрова И.С. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения / И.С. Петрова, М.Н. Винцонайте // Прикл. биохимия и микробиология. – 1966. – 2, № 1. – С. 322–327.
5. Романовская В.А., Авдеева Л.В., Гладка Г.В., Прутула И.Р., Хархота М.А., Таширев А.Б. Устойчивость к экстремальным факторам микроорганизмов прибрежных экосистем Мертвого моря // Микробиол. журнал. – 2013.– 75, № 3. – С. 3–11.
6. Davis B.J. Assay of naringinase / B.J. Davis // Anal. Biochem. – 1985. – 149, N 2. – P. 566–571.
7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R. J. Protein measurement with folinphenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951 – 193, N 2 – P. 265–275.
8. Masada M. Determination of the thrombolytic activity of Natto extract // Food style. – 2004. – 8, N 1. – P. 92–95.
9. Trombridg G.O. Purification of human elastase / G.O. Trombridg, H.D. Moon // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1972. – 141, N 3. – P. 928–931.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.

Отримано 10.01.2013