

**О.В. Мацелюх¹, Н.А. Нідялкова¹, Л.Д. Варбанець¹, Н.О. Андрєєва²,
В.В. Шепелевич³, П.П. Зелена³, Ю.М. Юмина³**

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного, НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ ДСП, Д03680, Україна

² Науково-дослідний центр «Державний океанаріум», вул. Епронівська, 7, Севастополь, 99024

³ Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології», кафедра мікробіології та загальної імунології,
вул. Володимирська, 60, Київ, 01033, Україна

ЗДАТНІСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ РІЗНИХ ЕКОЛОГІЧНИХ НІШ ДО ГІДРОЛІЗУ НЕРОЗЧИННИХ БІЛКІВ

Проведено скринінг продуцентів протеаз із специфічністю до нерозчинних і важкорозчинних білкових субстратів тваринного походження – колагену, фібрину, еластину і кератину. Досліджені бактеріальні ізоляти (24 штами), виділені з води вольєрів із дельфінами, перифітону вольєрів, а також з видихів, ротової порожнини і шкіри дельфінів. Здатність гідролізувати колаген (5-23 од/мг протеїна) і еластин (20-32 од/мг) була виявлена в обмеженої кількості бактеріальних культур, які було виділено з води і перифітону вольєрів. При цьому всі досліджені культури не мали здатності до синтезу позаклітинних кератиназ. Ізоляти стрептоміцетів (48 культур) були виділені з ґрунтів прибережної смуги Чорного моря міської зони м. Одеса, з морського берега, з паркової зони, з берега прісного озера у м. Саки, а також з ґрунту прибережної смуги Атлантичного океану біля м. Альбуфена (Португалія). Ізоляти стрептоміцетів виявилися перспективними продуцентами позаклітинних кератиназ і колагеназ: найвищу активність (до 5 од/мг) виявили штами, виділені з прибережних ґрунтів як моря, так і прісного озера в Саках.

Ключові слова: бактеріальні ізоляти, стрептоміцети, колагеназа, еластаза, кератиназа, фібринолітична пептидаза.

Пептидази (КФ 3.4) представляють найбільшу групу промислових ензимів і знаходять застосування в різних галузях промисловості [5]. Найбільш перспективним джерелом протеаз слід визнати мікроорганізми, що обумовлено необмеженістю джерел виділення, можливістю підбору умов біосинтезу та отримання суперпродуцентів шляхом селекції і генної інженерії, широким спектром субстратної специфічності ферментних комплексів, а також простотою і відносною дешевизною технологій. Серед позаклітинних пептидаз мікроорганізмів особливе місце посідають ензими, які здатні розщеплювати нерозчинні або важкорозчинні білки. До таких відносять: еластин і колаген, які є складовою волокон сполучної тканини, кератин, що є компонентом рогових похідних епідермісу шкіри, а також фібрин, який є основою кров'яних згустків судин. Утворення міжмолекулярних зшивок надає структурі цих білків еластичність, міцність і резистентність до протеолізу. Комплексні ферментні препарати з такою специфічністю можуть бути використані в різних галузях медицини та промисловості. Протеолітичні ферменти з фібринолітичною і коагулазною дією, можуть деякою мірою вирішити проблему створення тромболітичних препаратів [9]. Протеолітичні ферменти з колагеназною активністю використовуються у виробництві шкіри, для дезінтеграції сполучної тканини, отримання суспензії клітин або клітинних новоутворень, оскільки при збереженні життєздатності клітини необхідне вибіркоче руйнування позаклітинного матриксу без ушкодження поверхні живих клітин [18]. Колагенолітичні та еластолітичні ферменти мікроорганізмів можуть бути використані в медицині для терапії деяких захворювань печінки, грижі інвертебрального диску хребта, опіків, обморожувань, для прискорення відторгнення відмерлих тканин, трофічних виразок, для прискорення очищення гнійно-некротичних нальотів, в терапії опікових ран [1]. Мікробні кератинази набувають все більшого значення в біотехнології, оскільки

можуть застосовуватися в процесах зневолошування шкіри в шкіряній промисловості і в переробці кератину пера, що є одним із найвагоміших відходів на птахофермах [7].

На сьогодні зацікавленість мікробними кератиназами зростає також у зв'язку з випадковим відкриттям гідролізуючої дії кератиназ на білки-пріони. Таким чином, протеази, що продукуються мікроорганізмами, можуть бути використані для наукових і практичних потреб. Загалом, різноманіття властивостей мікробних колагеназ, еластаз, кератиназ і фібринолітичних протеаз та можливості їх використання вивчені недостатньо. Поряд із цим, слід зауважити, що ця група протеолітичних ферментів досі знайдена лише у небагатьох представників світу мікробів, і тому викликає зацікавленість і увагу дослідників для подальшого пошуку і вивчення.

Метою роботи був пошук нових продуцентів протеаз із здатністю до гідролізу нерозчинних білкових субстратів серед свіжовиділених ізолятів бактерій і стрептоміцетів.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження були позаклітинні протеази різних бактеріальних ізолятів і стрептоміцетів. Бактеріальні ізоляти (24 культури) були отримані у 2013 р. в науково-дослідному центрі Збройних Сил України «Державний океанаріум» з води вольєрів з дельфінами (позначення в номері ізоляту - В), перифітону вольєрів (П), а також з видихів (Vh), ротової порожнини (R) і шкіри дельфінів (К). Ізоляти стрептоміцетів (48 культур) були отримані співробітниками кафедри мікробіології та загальної імунології ННЦ «Інститут біології» (Київський національний університет ім. Тараса Шевченка). Ізоляти групи OM 1.12-10.12 виділені з ґрунту прибережної смуги Чорного моря міської зони м. Одеса в 2012. Ізоляти групи Pr 1.13-13.13 виділені з ґрунту прибережної полоси Атлантичного океану біля м. Альбуфена (Португалія) в 2013 р. Ізоляти групи KM виділено з ґрунту морського берега, КП – з ґрунту паркової зони м. Саки, а КО – з ґрунту берега прісного озера у м. Саки в 2012 р.

Бактеріальні ізоляти з видихів, ротової порожнини і шкіри дельфінів зберігали на м'ясопептонному агарі (МПА), а виділені з води і перифітону – на МПА, приготованому на морській воді або при додаванні 18 г/л морської солі. Ізоляти стрептоміцетів зберігали на вівсяному агарі і на твердому середовищі Гаузе.

Для визначення позаклітинних протеолітичних активностей бактеріальних ізолятів використовували рідке поживне середовище наступного складу (г/л): мальтоза – 1,0; желатин – 10,0; дріжджовий автолізат – 0,15, $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ – 1,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,75; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5 (рН 6,8-7,2) [2]. Для ізолятів, виділених з води і перифітону, в середовище додавали 18 г/л морської солі.

Для попереднього відбору культур стрептоміцетів, здатних синтезувати позаклітинні протеази, використовували чашки з молочним агаром. Для цього 20 % розчин знежиреного молока змішували з 3 % агаром в співвідношенні 1:1. Здатність синтезувати позаклітинні протеази оцінювали за діаметром зон гідролізу. Глибинне культивування відібраних культур проводили, використовуючи середовище такого складу (г/л): мальтоза – 40,0; пептон 20,0; $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ – 0,5; NaCl – 0,5; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; CaCl_2 – 0,01; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 (рН 7,2-7,4) [3]. Для виявлення кератиназної активності у середовище додатково вносили до 10 % знежиреного курячого пера.

Культивування мікроорганізмів на вказаних середовищах проводили глибинним способом у пробірках (10 мл) на качалці зі швидкістю перемішування 220 об/хв, при температурах 26-28 °С для стрептоміцетів та 36 °С – для бактерій. Біомасу відділяли центрифугуванням при 5000g, 15 хв і в надосадовій рідині визначали вміст білка і протеолітичні активності.

Білок визначали за методом Лоурі [10]. Еластазну активність ідентифікували колориметрично за інтенсивністю забарвлення розчину при ензиматичному гідролізі еластину, забарвленого конго червоним [15]. За одиницю активності приймали таку кількість ензиму, яка каталізує гідроліз 1 мг еластину за 1 хв. Колагеназну і кератиназну активність оцінювали за вмістом вільних амінокислот у реакційній суміші в реакції з нінгідрином [12]. За одиницю активності брали кількість мкмолей вивільнених амінокислот згідно зі стандартною кривою, побудованою за лейцином. Фібринолітичну активність визначали за методом Masada [11]. Утворення продуктів розщеплення фібрину вимірювали

на спектрофотометрі СФ-26 при 275 нм. За одиницю фібринолітичної активності брали таку кількість ензиму, яка підвищує оптичну густину реакційної суміші на 0,01 за 1 хв.

Питому активність виражали в од/мг протеїну.

Результати та їх обговорення. Найбільш важливою функцією екстрацелюлярних протеаз мікроорганізмів є гідроліз білків та інших високомолекулярних субстратів, які містяться в навколишньому середовищі, та перетворення їх у форму, яка здатна легко проникати всередину клітини. Нерозчинні і важкорозчинні білки тваринного походження практично не піддаються гідролізу протеазами, що обумовлено їх структурою. Так, ензими, які проявляють специфічність до зв'язків, утворених залишками аланіну, можуть відповідати, як за гідроліз білків з високим вмістом аланіну (наприклад, еластин), так і за руйнування клітинної оболонки та пригнічення росту інших мікроорганізмів [14].

На сьогодні вивчено велику кількість гідролаз наземних бактерій. При цьому дані щодо структури і функцій ензимів із морських об'єктів вкрай обмежені, але ті, що доступні, свідчать про переваги ензимів морського походження, такі, як висока активність, низький температурний оптимум, стійкість до хімічних модифікацій, стабільність при довготривалому зберіганні [8]. Особлива будова функціональних сайтів білкових молекул таких ензимів, що полягає в зменшенні кількості міжмолекулярних і внутрішньомолекулярних зв'язків і приводить до збільшення ефективності каталітичної реакції за рахунок зростання числа обертів активного центру, є одним із механізмів адаптації морських мікробів до навколишніх умов. Нами було досліджено здатність ряду бактеріальних ізолятів з води вольєрів із дельфінами (В), перифітону вольєрів (П), з видихів (Vh), ротової порожнини (R), а також шкіри дельфінів (К) гідролізувати нерозчинні білкові субстрати. Показано (рис. 1), що здатність гідролізувати фібрин (максимальна активність досягає показників 1,1 од/мг) спостерігається практично у всіх ізолятів, виділених як з води, так і з дельфінів. Здатність гідролізувати колаген (5-23 од/мг) і еластин (20-32 од/мг) (рис. 2, 3) було знайдено в обмеженій кількості культур, зокрема тих, які були виділені з води і перифітону вольєрів (В5, П2, П3). При цьому всі досліджені культури не мали здатності до синтезу позаклітинних кератиназ. Такі відмінності у спектрі синтезованих протеолітичних комплексів у першу чергу пояснюються відмінностями у будові білкових субстратів: фібрин за своєю структурою є полімеризованим фібриногеном, який більш доступний для гідролізу протеазами у порівнянні із суперспіралізованими еластином і колагеном.

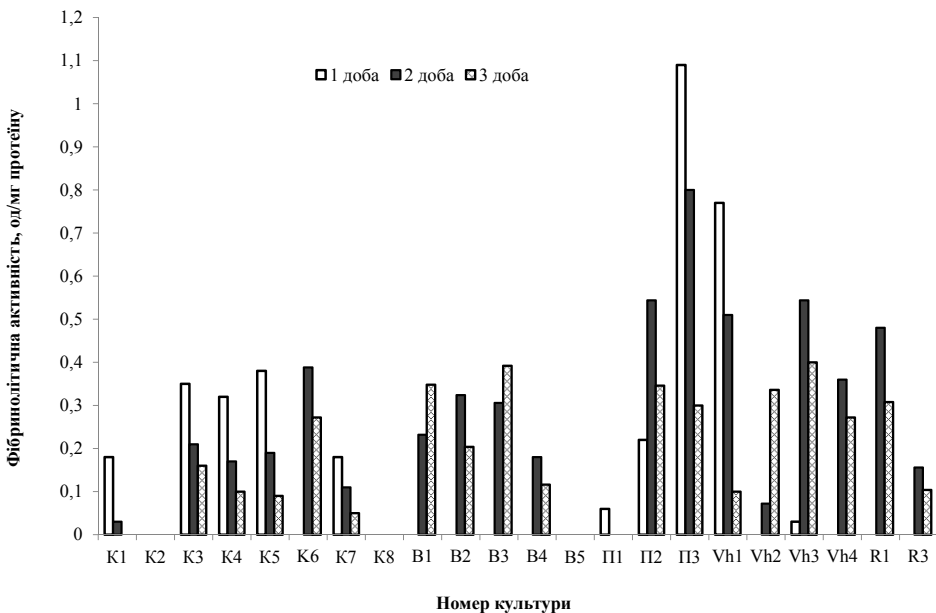


Рис. 1. Фібринолітична активність супернатантів культуральних рідин бактеріальних ізолятів

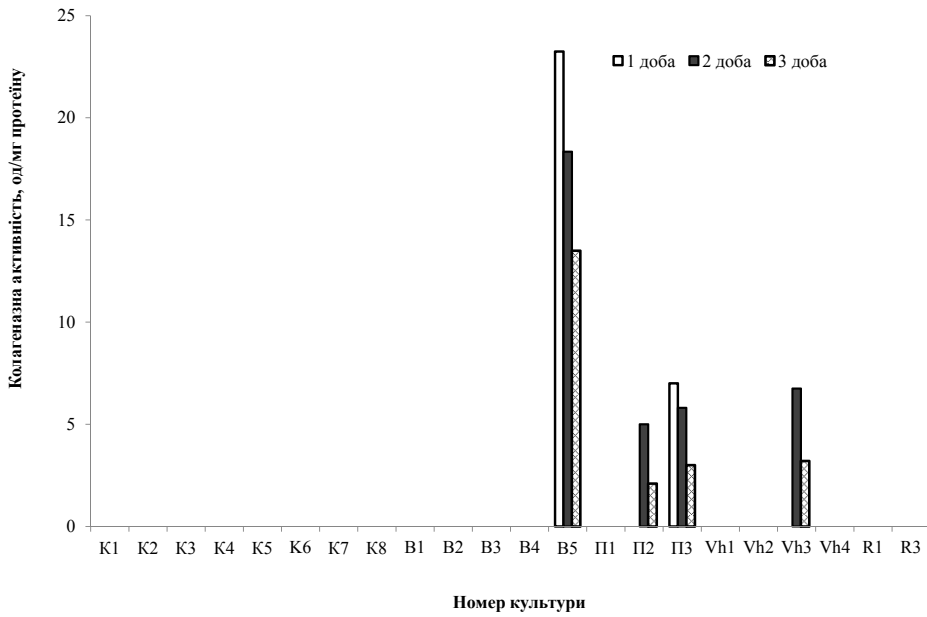


Рис. 2. Колагенолітична активність супернатантів культуральних рідин бактеріальних ізолятів

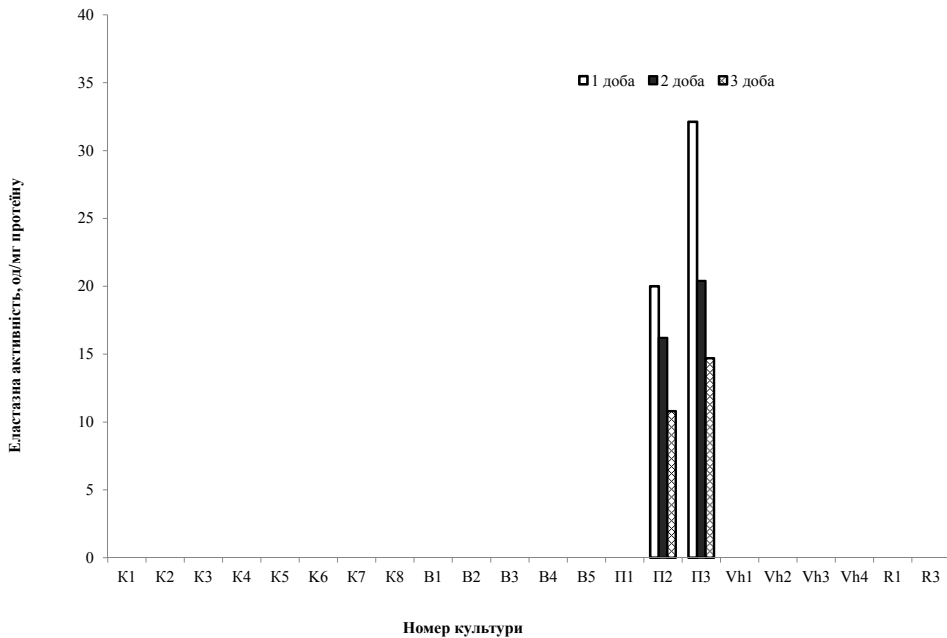


Рис. 3. Еластолітична активність супернатантів культуральних рідин бактеріальних ізолятів

Оснoву цих білків складають пролін і оксипролін (до 25 % від загальної кількості амінокислотних залишків у колагені) і аланін (до 20 % у еластині), тому протеази мають володіти певною первинною специфічністю для гідролізу цих білків. Також, виходячи з того, що у воді і вольєрах із дельфінами може не міститися кератинвмісних субстратів, можна пояснити і повну відсутність кератиназної активності у виділених ізолятів. Всі ізоляти проявляли максимум активності на 1 або 2 добу культивування. Слід зазначити,

що за активністю супернатантів культуральних рідин культури П2, П3, В5 і Vh1 не поступалися дослідженим нами раніше [3, 4, 6] продуцентам, що робить їх перспективними для подальшого застосування.

Інша група ізолятів представлена актиноміцетами, які відомі як активні продуценти позаклітинних протеолітичних ензимів, що деградують великий спектр білкових субстратів у широкому діапазоні рН і температур. Вони відомі також тим, що синтезують пептидази з нетиповим спектром субстратної специфічності та з аномальною термостабільністю. Маючи протеолітичний комплекс широкого спектру дії, стрептоміцети невибагливі до джерел живлення, завдяки чому широко розповсюджені в природі і легко культивуються в лабораторних умовах. Відомо, що вперше пептидазу з кератинолітичною дією було виділено саме з культуральної рідини актиноміцету *Streptomyces fradiae* в 50-х роках ХХ ст. [13]. Більшість описаних у літературі актиноміцетів – продуцентів кератиназ, колагеназ і фібринолітичних пептидаз виділено з ґрунтів, збагачених залишками білкової сировини [17, 19]. Натомість, в літературі дуже мало даних щодо здатності актиноміцетів гідролізувати еластин.

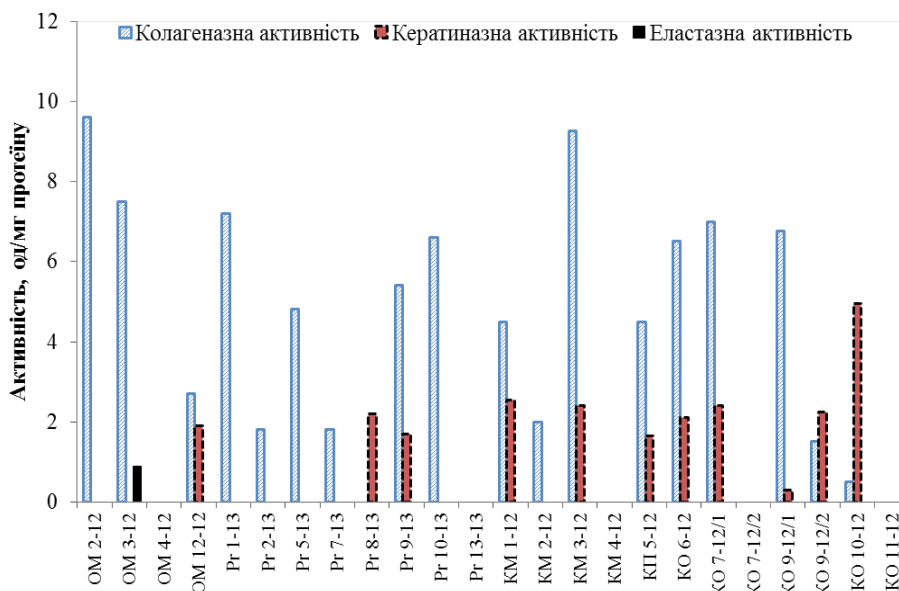


Рис. 4. Спектр активностей супернатантів культуральних рідин ізолятів стрептоміцетів

Дослідження здатності гідролізувати білки тваринного походження проводили на 48 культурах свіжовиділених стрептоміцетів із проб ґрунтів у містах Саки і Одеса, а також в м. Альбуфена (Португалія). Всі виділені ізоляти за кольором повітряного міцелію було попередньо віднесено до секції *Cinereus*, а за кольором субстратного міцелію – до групи *Chromogenes*. Дослідження здатності гідролізувати молочний агар дозволило відібрати 24 культури із здатністю до синтезу екзогенних протеаз (діаметр зон гідролізу коливався в межах від 11 до 15 мм). Надалі ці культури піддавали глибинному культивуванню для визначення спектра протеолітичних активностей. Показано (рис. 4), що 19 ізолятів проявляли колагеназну активність (від 2 до 10 од/мг), 11 ізолятів гідролізували кератин пера (2-5 од/мг) і лише одна культура ОМ 3-12 виявляла незначну еластазну активність (~ 1 од/мг). Слід зазначити, що для прояву ізолятами кератинолітичної активності в середовище необхідно додавати індуктор. У нашому випадку це було 10 % куряче перо. Нами не було встановлено також наявності фібринолітичної активності у будь-якої з культур. Отже, ізоляти стрептоміцетів виявилися перспективними синтетиками позаклітинних нейтральних протеаз, зокрема, кератиназ і колагеназ. Причому найбільш активними продуцентами є ізоляти з прибережних ґрунтів як моря, так і прісного озера в Саках.

Таким чином, в результаті проведеної роботи було виявлено декілька перспективних продуцентів протеолітичних ензимів, які за активністю не поступаються раніше описаним продуцентам [3, 4, 6]. Це культури П2, П3, В5 і Vh1, які виділено з води, перифітону вольєрів і видихів дельфінів. Їх фібринолітична активність становила до 1,2 од/мг, колагеназна – 23 од/мг, еластазна – 32 од/мг. Серед виділених культур стрептоміцетів було знайдено синтетики кератинолітичних ензимів з активністю до 5 од/мг культуральної рідини. Отже, знайдені продуценти протеаз надалі можуть бути використані для отримання ензимів із колагеназною, еластазною, фібринолітичною і кератиназною активністю. Дані ензими можуть знайти застосування у різних галузях промисловості і медицини.

***Е.В. Мацелюх¹, Н.А. Нидялкова¹, Л.Д. Варбанец¹, Н.А. Андреева²,
В.В. Шепелевич³, П.П. Зелена³, Ю.М. Юмина³***

*¹ Інститут мікробіології та вірусології НАН України,
ул. Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна*

*² Научно-исследовательский центр вооруженных Сил Украины «Государственный океанариум»,
ул. Эпронская, 7, Севастополь, 99024*

*³ Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, ННЦ «Институт биологии»,
кафедра микробиологии и общей иммунологии, ул. Владимирская, 60, Киев, 01033, Украина*

СПОСОБНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ НИШ ГИДРОЛИЗОВАТЬ НЕРАСТВОРИМЫЕ БЕЛКИ

Резюме

Проведен скрининг продуцентов протеаз, специфичных к нерастворимым и труднорастворимым белковым субстратам животного происхождения – коллагену, фибрину, эластину и кератину. Исследовались бактериальные изоляты (24 штамма), выделенные из воды вольеров с дельфинами, перифитона вольеров, а также из выдыхов, ротовой полости и кожи дельфинов. Способность гидролизировать коллаген (5-23 ед/мл) и эластин (20-32 ед/мл) была найдена у ограниченного числа бактериальных культур, выделенных из воды и перифитона вольеров. При этом все исследуемые культуры не обладали свойством синтеза внеклеточных кератиназ. Изоляты стрептомицетов (48 культур) были выделены из почвы прибрежной полосы Черного моря городской зоны г. Одессы, из морского берега, парковой зоны и берега пресного озера в г. Саки, а также из почвы прибрежной полосы Атлантического океана вблизи г. Альбуфена (Португалия). Изоляты стрептомицетов оказались перспективными продуцентами внеклеточных кератиназ и коллагеназ: самой высокой активностью (до 5 ед/мг) обладали штаммы, выделенные из прибрежных почв как моря, так и пресного озера в Саках.

Ключевые слова: бактериальные изоляты, стрептомицеты, коллагеназа, эластаза, кератиназа, фибринолитическая пептидаза.

***O.V. Matseliukh¹, N.A. Nidialkova¹, L.D. Varbanets¹, N.O. Andreeva²,
V.V. Shepelevych³, P.P. Zelena³, J.M. Yumyna³***

*¹ D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine,
154, Acad. Zabolotny str. D03680, Kyiv, GSP, Ukraine*

*² State Oceanarium, Scientific-Research Center of the Armed Forces of Ukraine,
7, Epronivska Str., Sevastopol, 99024*

*³ Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Center "Institute of Biology",
Department of Microbiology and General Immunology, 60, Volodymirska St., Kyiv, 01033, Ukraine*

ABILITY OF MICROORGANISMS FROM DIFFERENT ECOLOGICAL NICHES TO HYDROLYZE THE INSOLUBLE PROTEINS

Abstract

Screening of protease producers with specificity to insoluble and hard soluble protein substrates of animal origin (collagen, fibrin, elastin and keratin) was carried out. It was studied the bacterial cultures (24 strains) isolated from water and periphyton of enclosures with dolphins, and also from exhalations, oral cavity and skin of dolphins. Some bacterial strains isolated from water and periphyton of enclosures hydrolyzed collagen (5-23 U/ml) and elastin (20-32 U/ml). Thus all tested cultures did not possess the property of extracellular keratinases synthesis.

The streptomycetes (48 strains) were isolated from the soil of Black Sea coastal strip near Odessa and Saky, from parkland and the shores of freshwater lake in Saky and from the soil of Atlantic Ocean coastal strip near Albufena (Portugal). Several streptomycetes have been found to appear the perspective producers of extracellular keratinase and collagenase. The strains isolated from the soil of the coastal strip area both sea and freshwater lake in Saky possessed the highest activity (up to 5 U/mg).

Keywords: bacterial isolates, streptomycetes, collagenase, elastase, keratinase, fibrinolytic peptidase.

1. Абаев Ю.К. Раневые повязки в хирургии // Медицинские новости. – 2003. – № 12. – С. 30-37.
2. Бондарчук А.А., Ажицкий Г.Ю. Характеристика ферментного комплекса из *Bacillus mesentericus* // Микробиол. журн. – 1981. – 43, № 6. – С. 687-690.
3. Іванко О.В. Колагеназа і кератиназа стрептоміцетів: автореф. Дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук. : спец. 03.00.07 «мікробіологія» / О.В. Іванко. – Київ, 2003. – 20 с.
4. Мацелюх О.В. Особливості росту і біосинтезу еластази мутантним варіантом *Bacillus* sp. 27-88ELS+ // Біотехнологія. – 2011. – 4, № 3. – С. 43-50.
5. Мацелюх О.В., Левішко А.С., Варбанець Л.Д. Протеолітичні ферменти мікроорганізмів // Микробиол. журн. – 2010. – 72, №4. – С. 56-73.
6. Нідялкова Н.А., Мацелюх О.В., Варбанець Л.Д. Оптимізація середовища для синтезу фібринолітичної пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB В-7324 // Біотехнологія. – 2012. – 5, № 4. – С. 74-81.
7. Brandelli A., Daroit D.J., Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – 85, N 6. – P. 1735-1750.
8. Debashish G., Malay S., Barindra S., Joydeep M. Marine enzymes // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 2005. – 96. – P. 189-218.
9. 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.
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, № 1. – P. 265-275.
11. Masada M. Determination of the thrombolytic activity of Natto extract // Food style. – 2004. – 8, N 1. – P. 92-95.
12. Moore S., Stein W. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of aminoacids // J. Biol. Chem. – 1948. – 176. – P. 367.
13. Noval J.J., Nickerson W.J. Decomposition of native keratin by *Streptomyces fradiae* // J. Bacteriol. – 1959. – 77, N 3. – P. 251-263.
14. Salazar O., Asenjo J.A. Enzymatic lysis of microbial cells // Biotechnol. Lett. – 2007. – 29, N 7. – P. 985-994.
15. Trombridg G.O., Moon H.D. Purification of human elastase // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1972. – 141, №3. – P. 928-931.
16. Uesugi Y., Arima J., Usuki H., Iwabuchi M., Hatanaka T. Two bacterial collagenolytic serine proteases have different topological specificities // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – 1784, N 4. – P. 716-726.
17. Uesugi Y., Usuki H., Iwabuchi M., Hatanaka T. Highly potent fibrinolytic serine protease from *Streptomyces* // Enzyme Microb. Technol. – 2011. – 48, N 1. – P. 7-12.
18. Watanabe K. Collagenolytic proteases from bacteria // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – 63, N 5. – P. 520-526.
19. Zhao H., Mitsuiki S., Takasugi M., Sakai M., Goto M., Kanouchi H., Oka T. Decomposition of insoluble and hard-to-degrade animal proteins by enzyme E77 and its potential applications // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2012. – 166, N 7. – P. 1758-1768.

Отримано 28.05.2014